THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN LACHARME

Première Thèse ;

Mode d'Action des Tétracyclines sur divers Métabolismes de Phanérogames

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

SOUTENUES LE 20 JANVIER 1961 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. R. DOUIN, *Président*

MM. R. KUHNER, J. CHOPIN, *Examinateurs*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550007_0008

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

JEAN LACHARME

Première Thèse ;

Mode d'Action des Tétracyclines sur divers Métabolismes de Phanérogames

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

SOUTENUES LE 20 JANVIER 1961 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. R. DOUIN, *Président*

MM. R. KUHNER, J. CHOPIN, *Examinateurs*

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. H. LONGCHAMBON
R. DOUIN
A. MOUSSA

Professeurs Honoraires

MM. E. LOCQUIN
M. de LARAMBERGUE
J. DOEUVRE
E. SOLLAUD
Ch. MENTZER
A. MOUSSA

Doyen

M. H. GAUTHIER

Assesseur

M. M. PRETTRE

Professeurs

MM. H. LONGCHAMBON, Minéralogie
R. DOUIN, Botanique
G. DEJARDIN, Physique générale
H. EYRAUD, Calcul différentiel et intégral
M. PRETTRE, Chimie industrielle
C. COURTY, Chimie-Physique
R. KUHNER, Microbiologie et Mycologie
D. CORDIER, Physiologie
G. MALECOT, Mécanique rationnelle et appliquée
R. PARIS, Chimie minérale
M. AUMERAS, Chimie
J. COLLONGE, Chimie organique
J. JANIN, Physique expérimentale
J. FLANDRIN, Géologie appliquée
R. BERNARD, Physique industrielle
J. DUFAY, Directeur de l'Observatoire, Astronomie
V. NIGON, Zoologie expérimentale
H. GAUTHIER, Géologie
J. VIRET, Géologie
J. WAUTIER, Zoologie
J. CHOPIN, Chimie biologique
J. BRACONNIER, Mathématiques
J. CUEILLERON, Chimie
Ch. EYRAUD, Chimie minérale
P. JAFFARD, Méthodes mathématiques de la Physique
N..., Physique nucléaire

Professeurs sans chaire

MM. A. BOUTILLIER, Minéralogie
J. BOIDIN, Botanique
G. MESNARD, Physique
M. GIGOUT, Géologie
J. LAFOUCRIERE, Physique nucléaire
J. DREUX, Chimie organique SPCN
R. GRANDMONTAGNE, Physique

Maîtres de Conférences

MM. S. TEICHNER, Chimie industrielle
J. DEPRAZ, Physique nucléaire
R. FERON, Mathématiques
F. GAUME, Physique
H. PACHECO, Chimie biologique
J.C. MERLIN, Chimie MPC
M. PAVANS de CECCATTY, Zoologie
G. PHILBERT, Physique nucléaire
R. UZAN, Physique SPCN
J.M. LEGAY, Zoologie expérimentale
G. BERSILLON, Physiologie végétale SPCN
G. PERES, Physiologie
L. DAVID, Géologie
A. LAFORGUE, Physique MPC
J. GAUTHIER, Chimie SPCN
M. CHENEVOY, Géologie appliquée
J. CHANEL
Melle M. MAITROT, Physique
M. M. DUFAY, Physique générale

Maîtres de Conférences Adjoints

MM. P. PIERRON, Chimie
H. LEMONDE, Physique

Chargés de cours complémentaires

MM. M. STRIFFLING, Météorologie et Physique du Globe
J. FIASSON, Zoologie-Agrégation
M. MURET, Botanique-Agrégation
G. MAZENOT, Géologie-Agrégation
C. TRANCHAT, Physique-Chimie - Agrégation
Melle S. FIASSON, Zoologie
MM. F. PENNANEAC'H, Mathématiques générales
P. CHALLEAT, Mathématiques

Secrétaire

M. J. BURNET

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. NETIEN

A MA FEMME,

en témoignage de mon
affection et de mon
fidèle attachement.

A MA MERE et
MON PERE,

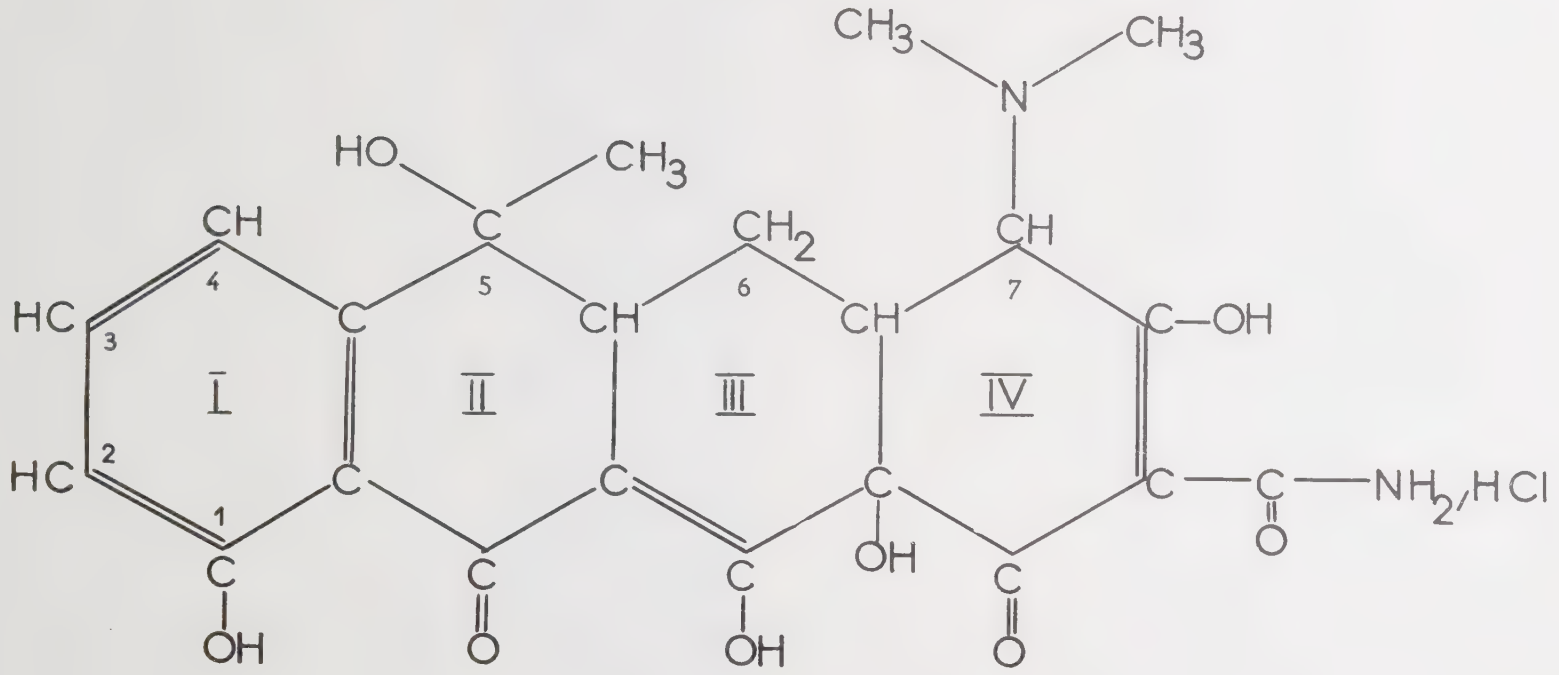
en souvenir.

A MES PARENTS.

PRÉFACE

Les Tétracyclines représentant un groupe d'antibiotiques qui ne différent que par la substitution simple d'un groupement sur un noyau tétracyclique de constitution assez complexe. Le premier antibiotique de ce groupe fut commercialisé sous le nom d' Auréomycine; ce dérivé chloré, la Chlorotétracycline est synthétisé par *Streptomyces aureofaciens* des jus de culture duquel il est isolé. Une culture de *Streptomyces rimosus* livre bientôt un dérivé voisin, l'Oxytétracycline déposé sous le nom commercial de Terramycine. Enfin, le noyau non substitué, la Tétracycline complétera rapidement cet arsenal thérapeutique sous le nom de Sanclomycine : ce dernier est actuellement obtenu par hydrogénation catalytique de la Chlorotétracycline. Ces composés sont basiques et sont utilisés la plupart du temps sous forme de chlorhydrate.

Le noyau de base, correspondant à la Tétracycline présente une structure assez complexe qui est la suivante :



CHLORHYDRATE DE TÉTRACYCLINE

poids moléculaire de la base: 444

Les quatre cycles supportent de nombreux groupements réactifs. Les deux autres antibiotiques se différencient de la Tétracycline par l'addition d'un Chlore en 4 sur le noyau I pour la Chlorotétracycline (poids moléculaire : 478,5) ou par la présence d'un hydroxyle en 6 sur le noyau III pour l'Oxytétracycline (pds mol. 460).

La similitude de structure confère à ces antibiotiques une activité antibactérienne identique. La présence ou l'absence de l'un ou l'autre groupement -Cl ou -OH ne se traduit que par des effets secondaires, non négligeables du point de vue thérapeutique (augmentation de stabilité du produit, meilleure tolérance, etc...), mais qui toutefois ne change pas le sens initial de leur activité.

Actuellement ces composés sont très bien connus du point de vue chimique; de plus, un nombre extraordinaire de publications, surtout médicales, ont mis en évidence leurs propriétés bactériostatiques et l'importance de leur spectre microbien, leurs conditions d'utilisation, leurs effets secondaires en thérapeutique. Par contre, leur mode d'action au niveau de la cellule bactérienne ou autre, reste encore à peu près inconnu. Un tel problème est vaste et nous avons pensé que nous pourrions apporter ici une pierre à la construction de l'édifice.

Le matériel vivant de notre expérimentation nous éloigne toutefois de l'aspect classique de telles recherches puisque nous avons étudié le mécanisme d'action des Tétracyclines non pas sur des bactéries mais sur des végétaux supérieurs.

Le choix d'un tel sujet ne nous fut pas dicté; il continuait tout naturellement une série de travaux chers à Monsieur le Professeur NETIEN, qui nous accueillit au laboratoire et auprès de qui, depuis ce temps déjà fort lointain , nous avons toujours trouvé un avis autorisé et une aide affectueuse; nous n'eûmes ainsi jamais l'idée de chercher une autre voie de travail que celle dont il nous avait toujours entretenu avec un enthousiasme jamais démenti. Nous tenons à lui dire toute l'estime et les profonds sentiments que nous avons pour lui.

En 1952, nous avons suivi les cours de Monsieur le Professeur DOUIN et de Monsieur le Professeur KÜHNER et nous sommes heureux de l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'être aujourd'hui nos juges.

Monsieur le Professeur DOUIN nous a toujours réservé un accueil très cordial; sa bienveillance a été pour nous chose précieuse et nous lui en garderons une respectueuse gratitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur KÜHNER de la sympathie qu'il a toujours manifestée à notre égard et nous tenons à l'assurer de notre grande et respectueuse admiration.

Monsieur le Professeur CHOPIN nous a fait profiter largement de ses connaissances et nous a permis d'éclairer quelques points obscurs de notre travail; il nous a prodigué ses conseils avec une grande gentillesse. Nous le remercions et l'assurons de notre reconnaissance.

Par l'initiale pharmaceutique de nos études, nous pensons également à nos maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie qui ont contribué à ce travail, sinon directement, tout au moins par les connaissances qu'ils nous ont dispensées en un enseignement précis et varié.

Nous tenons à remercier nos amis et les collaborateurs du Laboratoire qui nous ont maintes fois apporté une aide dont nous leur sommes fort reconnaissant.

Enfin notre souvenir va vers un camp d'Autriche , où tous étions élèves et maîtres; dans cette école nous avons appris à faire survivre le corps et l'esprit; que par devers le Professeur GILBERT-DREYFUS Président de l'Amicale de Mauthausen, ce travail soit un hommage à tous nos camarades morts et survivants.

HISTORIQUE

La recherche du mode d'action des antibiotiques ne représente que l'étude particulière d'un problème biologique beaucoup plus général, l'antibiose. Bien avant que les découvertes de Fleming et de Waksman, puis les travaux de Florey, Chain, Heatley, Robinson ne vinssent apporter une arme des plus efficaces au traitement des maladies infectieuses, le phénomène d'antibiose était connu depuis un certain temps déjà et notamment par Pasteur. C'est à Ward (1899) que l'on doit ce terme. Le qualificatif de ce mot, antibiose, devait par la suite prendre un sens plus restrictif. L'étymologie de ce terme pouvait aussi bien le faire attribuer à la destruction des rongeurs par les rapaces qu'à la destruction de certaines bactéries par les moisissures. Les découvertes de Fleming et de Waksman allaient conférer au mot antibiotique un sens plus restreint, plus précis. Waksman et ses collaborateurs en 1947 définissaient comme antibiotique :

" toute substance chimique produite par un microorganisme ayant la propriété d'inhiber la crois-
" sance et même de détruire les bactéries et autres microorganismes d'une manière spécifique"

définition qui fut complétée en 1951 par la spécification : " en solution diluée ".

Les recherches de substances antibiotiques furent tout d'abord limitées à la seule étude de produits élaborés par les moisissures et certaines bactéries; actuellement le champ d'investigation s'est considérablement élargi et Oddoux a montré que les champignons supérieurs, les Homobasidiés en particulier, étaient en ce sens aussi dignes d'intérêt que les champignons inférieurs.

Parallèlement à ces travaux de prospection, la littérature cite abondamment des auteurs qui, sans qu'ils se soient penchés sur l'ensemble du problème, ont publié des conclusions ou des observations intéressant certaines particularités du mode d'action des antibiotiques principaux : Pénicilline, Streptomycine, Chloramphénicol, Tétracyclines, Gramicidine, Tyrocidine, etc... Actuellement le mode d'action des antibiotiques n'est élucidé que fort partiellement. La complexité de structure des antibiotiques, le nombre des groupements chimiques réactifs de chacune de ces molécules entrainent une complexité fonctionnelle correspondante sur les systèmes biochimiques; ceci explique pour une grande part l'ignorance relative qui entoure leur mode d'action.

Nous avons choisi, pour notre part, d'étudier le mode d'action des Tétracyclines appliquées à des cellules végétales. Nous nous éloignons par là du problème qui intéresse les thérapeutes en ce sens que le matériel vivant expérimenté n'est pas représenté par des bactéries mais par des organismes complètement différents. Mais, s'il est possible de souligner assez facilement toutes les différences qui peuvent exister entre une bactérie, une culture de tissus de Carotte ou une plantule de Radis, rien ne nous permet, à priori, de penser que ces substances vivantes n'utilisent pas, pour survivre, des processus métaboliques identiques ou tout au moins très voisins, de telle sorte que l'étude des lésions biochimiques provoquées par l'antibiotique sur des cellules végétales puisse faciliter l'étude du mode d'action de celui-ci au niveau de la bactérie.

Une bibliographie importante de ces dernières années témoigne de l'intérêt pris par les botanistes à ce sujet (Nétien 1960); ces travaux ont parfois été pris sous des angles assez particuliers : essais d'utiliser les antibiotiques dans le traitement de certaines maladies végétales, recherche de leur phytotoxicité, présomption de propriétés accélératrices de croissances, étude de leur action au niveau de quelques chaines métaboliques.

Les effets des antibiotiques ont tout d'abord été étudiés sur la germination des graines; de tous les antibiotiques commercialisés, le groupe des Tétracyclines semblerait être quelque peu inhibiteur par rapport aux autres (Euler 1955, Sotty 1955) ; encore, les auteurs ont ils dû employer des concentrations très élevées (0,2%) pour obtenir quelque résultat, de telle sorte que l'on doit conclure à une parfaite innocuité de ces composés sur le processus germinatif, tout au moins à des doses usuelles.

Par contre si cette action ne se manifeste pas sur le pouvoir germinatif, on constate, dans les stades ultérieurs, un très net ralentissement de la croissance s'accompagnant parfois de troubles morphologiques. Le phénomène est facile à examiner lorsque l'on suit la germination d'une graine initialement immergée dans la solution de l'antibiotique: la germination s'effectue normalement; mais très rapidement, la racine est inhibée alors que la tige présente parfois une croissance peu ralentie. Ces effets se produisent avec presque tous les antibiotiques; Von Euler (1947), Wright (1951), Cortesi (1955), Gray (1955), Sotty (1955) confirment cette action. Von Euler (1953 et 1955) montre qu'à la dose de 5mg par litre les Tétracyclines ralentissent la croissance du Blé et de l'Orge; par contre Cortesi (1955) note une légère stimulation de la tigelle de Maïs et de Pois avec des doses de 20 mg/l. Si les tigelles ont une croissance peu ralentie sous l'action de l'antibiotique, ce que souligne la plupart des publications, les racines présentent par contre un aspect en "griffe" qui est particulièrement net avec les Graminées (von Euler 1947; Mentzer et coll. 1952).

La diversité du matériel végétal employé par tous les auteurs montre que la sensibilité aux antibiotiques varie selon les espèces et également suivant la qualité des réserves de la graine (Nétien et Lacharme 1959).

Enfin en 1954, Signol montre que l'application d'une même dose d'antibiotique, avant, pendant ou après la germination, provoque un ralentissement de la croissance d'autant plus important que l'antibiotique a été appliqué d'une façon plus précoce.

Certains travaux ont été réalisés suivant des protocoles expérimentaux mettant en contact le système radiculaire des plantules avec des solutions antibiotiques : on constate dans ces conditions un ralentissement de la croissance des racines avec modifications morphologique et cytologique alors que la tige est peu modifiée. Cet effet, sous l'action des Tétracyclines, a été constaté notamment sur le Lupin blanc par Della Bella et Gabellini (1950).

Un test d'activité peut être basé sur l'apparition des racines latérales d'un plantule de Pois et le rapport de leur poids sec avec celui de la racine principale; Schöpfer en 1951 signale en effet que les antibiotiques assurent le blocage des radicelles de *Pisum sativum* ainsi d'ailleurs que l'arrêt dans le développement des paires de racines latérales du Blé.

La sensibilité des méristèmes des racines vis à vis des antibiotiques varie suivant l'espèce végétale.

L'absorption des antibiotiques par la racine est très rapide; un temps de contact de quelques minutes suffit pour obtenir une inhibition lorsque la plantule est replacée dans un milieu nutritif normal (Schöpfer, 1951 et 1952); Blanchard et Dillar en 1951 publient une étude sur le passage de la Chlorotétracycline dans la plantule de *Phaseolus lunatus*.

Plusieurs travaux, en particulier de Crowdy et Pramer (1955) sur la Fève, la Tomate, le Concombre, le Blé, la Laitue, montrent que l'antibiotique est capable de passer, en un temps relativement court, de la racine aux différents organes de la plante: ayant étudié non seulement les antibiotiques du groupe Tétracycline, mais également le Chloramphénicol, la Streptomycine, la Pénicilline, la Néomycine et la Viomycine, les auteurs notent que le transfert est fonction du caractère acide, basique ou amphotère du composé, les antibiotiques neutres ou acides diffusant plus rapidement.

Tous ces travaux relatés intéressent des expériences de laboratoire; parallèlement des recherches furent entreprises pour juger du rôle que pourraient avoir sur des cultures certains antibiotiques incorporés au sol. Alors que les antibiotiques se révèlent, dans les expériences de laboratoire sur milieux liquides comme des éléments phytotoxiques, de nombreux auteurs ont montré que ces mêmes composés placés dans le sol, avaient, dans les conditions habituelles de culture, des effets de stimulation sur les plantes.

En 1952, Nickell obtient une augmentation dans le pourcentage de germination des graines d'Oseille, et un rendement de croissance supérieur de 20% en incorporant au sol 5mg d'Oxytétracycline par kg de terre; il note des effets identiques sur d'autres espèces, Maïs et Concombre. Cette action peut toutefois être provoquée par d'autres antibiotiques. Plusieurs travaux ont confirmé les observations de Nickell, parmi lesquels ceux de Leopold et Guernsey (1953) et ceux de Ventura (1952).

En 1953-1954, Cortesi et Girard expérimentent, en sol, sur des cultures de Radis qu'ils arrosent quotidiennement avec des solutions de différents antibiotiques et notamment avec de la Chlorotétracycline et de l'Oxytétracycline sous forme de chlorhydrate aux concentrations respectives de 0,40 et 0,50 gramme pour environ 100 litres de solution. Ces expériences permettent aux auteurs de conclure ainsi : l'Oxytétracycline et la Chlorotétracycline possèdent une action favorisante sur la floraison; les plantules traitées par ces antibiotiques paraissent plus vigoureuses que les témoins.

Plusieurs facteurs peuvent modifier les " effets favorables" dûs à ces substances. La stabilité de l'antibiotique dans le sol peut être illusoire; la disparition, l'altération ou la diminution de l'effet antibiotique peuvent être attribuées à de nombreuses causes telles que : présence d'argile dans le sol (Gottlieb - 1952), lessivage, inactivation chimique (Winter et Wileke 1951). Le jeu de ces différents facteurs permet d'expliquer les conclusions contradictoires auxquelles sont arrivés d'autres expérimentateurs; Barton et Mac Nab, en 1954, n'observent aucune action de l'Oxytétracycline sur des cultures de Luzerne, Carotte, Blé, Concombre, Maïs, Epinard et Tomate.

Dans le cas de culture en sol les observations sont contradictoires; les facteurs inconnus inhérents à ce mode d'expérience rendent encore plus délicates les interprétations et les hypothèses qui peuvent en découler; parmi celles-ci, l'une fait état d'une action indirecte où l'antibiotique agirait par modification de la microflore du sol, favorisant le groupe des bactéries responsables de la nutrition azotée qui détermineraient une accélération de la croissance du végétal. A l'appui de cette théorie Hervey, en 1955, obtient avec différents antibiotiques, dont l'Oxytétracycline, une nitrification plus intense des sols et note une augmentation des nodosités sur la racine de Luzerne. Par contre, Canellas (1953), n'observe pas de parallélisme entre la croissance des végétaux et la modification de la microflore.

Doit-on attribuer à une seule action indirecte une activité stimulatrice des Tétracyclines ou de tout autre antibiotique sur la croissance de certains végétaux ? Une publication de Nickell et Finaly ne semblerait pas confirmer ce point de vue; ces auteurs, cultivant aseptiquement en milieu nutritif des frondes de *Lemna minor* constatent au bout de 8 semaines une multiplication des frondes avec augmentation du poids sec pour les lots cultivés en présence d'Oxytétracycline et également de Pénicilline et de Bacitracine.

De tous ces travaux, parfois contradictoires, il se dégage certains faits que nous pourrons résumer ainsi :

- lors des expériences faites en laboratoire, les Tétracyclines apparaissent presque toujours comme des inhibiteurs de croissance.

- des différentes expériences réalisées en sol, certaines ont permis de mettre en évidence un effet stimulateur dû aux antibiotiques.

- les diverses espèces de Spermaphytes expérimentées ne présentent pas la même sensibilité dans des conditions expérimentales identiques.

Si nous trouvons de nombreux travaux concernant l'action des antibiotiques sur les Phanérogames ceux qui intéressent les Cryptogames sont par contre assez rares. Cependant, des expériences en cours de Oddoux et Roux (communication orale), sur la croissance des mycéliums d'Homobasidiés en présence d'antibiotiques montrent que le comportement de ces végétaux est complètement différent de ceux que nous avons relatés jusqu'alors; les antibiotiques ne provoquent à peu près pas d'inhibition mais se comportent au contraire comme de véritables facteurs de croissance. C'est ainsi que la Tétracycline favorise le développement de *Amanita rubescens* Fr. ex Pers., *Marasmius Buxi* Q., *Corticium velleroum* Ell. et Crag. et *Lactarius torminosus* Fr. ex Schaef. var. *sublateritius* Kühn-Romagn., à des concentrations variant suivant les espèces entre 1 et 100 mg/litre. Les dérivés chloré et hydroxylé n'ont aucune action stimulatrice sur les deux premières espèces citées. Les trois antibiotiques n'ont aucune activité sur le développement de *Psilocybe coprophila* Fr. ex Bul. et *Melanoleuca graminicola* Vel. Ces auteurs ont également essayé d'autres antibiotiques avec lesquels ils ont observé le même phénomène de stimulation. Cette différence de réaction vis à vis des Tétracyclines, entre les champignons et les végétaux supérieurs ne saurait nous surprendre lorsque l'on connaît les possibilités d'adaptation biochimique de certains champignons.

Ces observations ont un côté pratique qui nous a très souvent gêné au cours des expériences; sur les champignons inférieurs les Tétracyclines ont une action encore plus stimulatrice que celle observée par Oddoux sur les Homobasisiomycètes de telle sorte que les lots de plantules traitées s'infectent très rapidement; nous avons toujours été obligés de stériliser superficiellement les téguments des graines avec une solution de bichlorure de mercure et d'opérer par la suite avec le maximum de soins, pour éviter de tels aléas.

Ces observations globales du phénomène de croissance sous l'action d'antibiotiques ont été parfois complétées par des recherches dirigées vers un but plus précis. Un certain nombre de travaux font état des effets provoqués par ces substances au niveau de diverses chaines métaboliques.

De telles expériences n'ont pas toujours été conduites sur des plantules mais sur des cultures *" in vitro "* de différents tissus (de Ropp-Nickell-Camus et Lance- Nétien et coll.etc). Nous relaterons plus précisément ces travaux au cours des chapitres ultérieurs.

L'un des aspects les plus frappants de l'action des antibiotiques est certainement la disparition ou la diminution importante des chlorophylles et c'est dans cette voie de recherches que se sont engagés plusieurs chercheurs. La plupart des expériences ont été faites avec des solutions de Streptomycine . Dès 1947 Von Euler signale l'action antichlorophyllienne de cet antibiotique sur les Graminées; il confirme et développe ses observations au cours de plusieurs publications. Signol en 1954 observe les mêmes effets. La Streptomycine bloque, non seulement la formation des chlophylles, mais aussi celle des caroténoïdes (Schöpfer et coll.). En réalité, la chlorose et l'inhibition de la caroténogénèse se sont pas obtenues avec la seule Streptomycine, mais aussi avec un certain nombre d'antibiotiques dont les Tétracyclines (Nétien et Lacharme).

Cette chlorose a été surtout étudiée sous l'angle cytologique; Euler, Bracco et Heller montrent que, sous l'effet de l'antibiotique, le chondriome dans les cellules de feuilles d'Orge ne peut se différencier. Signol en 1954 observe que, chez les plantules d'Orge et les prothalles de fougères cultivés *" in vitro"*, les chloroplastes présentent une altération irréversible avec vésiculation et diminution importante de leur taille et de leur chromaticité.

Ces actions ne sont obtenues avec intensité que dans la mesure où l'antibiotique a été appliqué précocément dans le cours du développement de la plantule et mieux au stade de la graine. En effet, lorsque l'antibiotique est mis en présence d'une plante ayant poussé à l'obscurité, étiolée, mais déjà différenciée, les feuilles ne tarderont pas à verdir dès leur exposition à la lumière. De même, les Tétracyclines appliquées sur des feuilles normales ne seront pas capables de les décolorer (De Deken-grenson 1955 ; Nétien et Lacharme 1957).

Des observations à peu près analogues ont été faites sur des Algues en particulier sur *Euglena gracilis* par Provasoli et coll. (1958) et sur *Chlorella vulgaris* par Lwoff et Schaeffer en 1948. Les auteurs ont même obtenu une décoloration somatique héréditaire.

Nétien et Lacharme (1955 a et b) notent que la diminution de chlorophylles chez les Crucifères traitées par les Tétracyclines s'accompagne d'une augmentation de la formation des pigments anthocyaniques.

Les modifications apportées au rendement de certains systèmes enzymatiques ont été étudiées par différents auteurs (Euler, Camus et Lance, Macht et Hoffmaster) mais ne nous intéressent pas précisément puisque ces expériences mettaient en jeu la Pénicilline et la Streptomycine et non les Tétracyclines.

Les échanges gazeux respiratoires et leur modification sous l'effet des Tétracyclines ont fait l'objet de recherches de Ventura et Hollanda (1956) ; ces auteurs observent une dépression dans la respiration des coléoptiles de Maïs et des tissus de Carotte soumis à l'action de l'antibiotique.

La croissance peut être considérée comme le reflet de l'intensité de la protéogénèse. Les troubles du métabolisme azoté sous l'effet des Tétracyclines ont été étudiés par Sorm et coll. (1953, 1954 et 1955) Zelinkova et coll. -(1954 et 1955), Nétien et Lacharme. Ces auteurs observent l'accumulation de certains acides aminés variables suivant le matériel végétal employé mais que l'on peut résumer comme étant, soit des acides aminés de réserve (arginine dans le Pois ou la culture de tissus de Topinanbour), soit des acides directement liés au cycle de Krebs (alanine, acide aspartique dans le Radis, la Moutarde ou le Blé).

Tous ces travaux cités intéressent le mode d'action des Tétracyclines sur les végétaux; en réalité le premier matériel vivant qui servit de test d'étude de l'action des antibiotiques fut, évidemment le groupe des Bactéries. Les Tétracyclines possèdent un large spectre microbien comme le Chloramphénicol, propriété qui leur a valu la désignation d'antibiotiques à large spectre. Ces antibiotiques peuvent produire chez certaines bactéries une résistance croisée, ce qui conduit à supposer que leurs modes d'action sont , dans une certaine mesure, apparentés.

Toutefois, un examen de la structure chimique de ces antibiotiques montre que ces molécules diffèrent énormément. Il est difficile d'admettre que ces molécules réagiront sur une même structure biologique spécifique d'un organisme, et par là produiront des mécanismes identiques d'inhibition. Il apparait plus sage de penser qu'il n'y a pas une identité d'action exacte mais que ces composés provoquent un blocage métabolique concourant, par des voies différentes, à l'élaboration d'un produit final commun.

Hahn et Wisseman en 1951 ont montré que ces antibiotiques bloquaient la synthèse induite d'un certain nombre d'ensymes que l'on trouve chez *Escherichia coli,* enzymes oxydant le lactose, l'arabinose, le maltose, les acétates. Par contre, lorsque ces ferments sont formés, le Chloramphénicol et les Tétracyclines n'ont plus d'action sur ceux-ci et ne gênent en rien la réaction enzymatique. En réalité la synthèse des diastases représente le cas particulier d'un processus plus général qui est la protéogénèse. Ces mêmes auteurs ont montré, Wisseman en 1954, Hahn en 1957, par des procédés chimiques et cytologiques, que l'adjonction des antibiotiques à une culture proliférante de colibacilles, provoquait aussitôt un arrêt de la synthèse protéinique, mais que durant le temps de cette bactériostase stricte, d'autres synthèses se poursuivaient et qu'il était possible de suivre l'accumulation des acides désoxyribonucléique dans le micro-organisme.

L'inhibition spécifique de la synthèse protéinique bactérienne non seulement par le Chloramphénicol mais aussi par la Chlorotétracycline et l'Oxytétracycline à des concentrations faibles, a été également démontrée par Gale et Folkes (1954) ; utilisant des concentrations importantes de ces antibiotiques ces mêmes auteurs ont montré qu'il était possible d'affecter la synthèse des acides nucléiques, mais que ce phénomène ne s'observe pas lorsqu'ils utilisent des doses usuelles bactériostatiques.

L'utilisation à doses cytotoxiques des Tétracyclines et leur complexité moléculaire expliquent que certaines conclusions d'auteurs soient parfois contradictoires. Il existe, d'autre part, un aspect du problème particulier à ces antibiotiques : ces composés sont des agents de chélation suffisamment forts pour lier différents ions métalliques. La Chlorotétracycline peut, à concentration assez élevée, inhiber les systèmes d'oxydation et de phosphorylation oxydative nécessitant la présence d'ions Magnésium (Loomis, 1950) ; cette inhibition ne se produit pas en présence d'un excès de Mg^{++}.

La chélation du Manganèse par la Chlorotétracycline est à l'origine d'un travail de Saz et Martinez qui étudient le comportement d'un système enzymatique bactérien, réducteur des groupements nitrés, en présence de l'antibiotique. Cette nitroréductase est fortement inhibée par la Chlorotétracycline mais l'inhibition est annulée par un excès d'ions Manganèse. Malgré ces résultats, l'action chélatante des Tétracyclines ne peut pas être considérée comme la raison majeure de l'activité antibiotique spécifique. En effet, la nitro-réductase bactérienne est également inhibée par les produits de dégradation de la Chlorotétracycline, non actifs du point de vue antibiotique. De plus, le Manganèse biochimiquement actif, se trouve presque toujours engagé sous forme de métallo-flavo-protéines et les liaisons " Flavine - Mn^{++} " sont plus fortes que celles de ce métal avec la Tétracycline (Saz et Martinez 1956).

De tous ces travaux, un seul fait reste probant : les Tétracyclines stoppent la condensation des amino-acides dans la voie de la protéogénèse mais le niveau de ce blocage n'a pas pu être précisé.

CHAPITRE I

ACTION DES TÉTRACYCLINES SUR LES PHÉNOMÈNES DE CROISSANCE

I - ACTION DES TETRACYCLINES SUR LA CROISSANCE DES PLANTULES DE DIFFERENTES ESPECES

Nous envisagerons dans ce chapitre des expériences différant par la modalité d'application de l'antibiotique. Dans une première série d'expériences, les graines sont immergées dans des solutions à concentrations molaires décroissantes puis placées sur boîtes de Pétri. Dans une deuxième partie, nous envisagerons la phytotoxicité de ces composés sur le développement des racines latérales de *Pisum sativum L.*

A - Essais portant sur des semences de différents types après que celles-ci aient été mises en contact avec l'antibiotique.

Raphanus sativus L. var. Orléans
Triticum sativum Lam. var. Vilmorin 27
Ervum Lens L. var. verte du Puy
Pisum sativum L. var. Express Alaska

Protocole expérimental .

Les semences, préalablement stérilisées, sont trempées pendant 12 heures dans des solutions à concentration molaire des trois Tétracyclines ; après lavage, les graines sont disposées régulièrement en boîtes de Pétri, par lots de 30 unités; germination et développement des plantules sont poursuivis en chambre climatisée à une température de 22°C sous éclairage artificiel (lampes Phytor L.F.40) de 16 heures sur 24. Les prélèvements des racines et des tiges sont effectués au 7ème jour; les longueurs ont été calculées statistiquement sur des lots de 30 individus; les poids frais et secs correspondent aux moyennes de ces lots.

Résultats

Les longueurs, sont exprimées en millimètres et l'écart type avec une probabilité de 95%. Les poids frais et secs correspondent à ceux d'un individu et sont évalués en milligrammes.

RAPHANUS SATIVUS L. var. Orléans.

		Témoin	M x 10^{-3}	2M x 10^{-4}	M x 10^{-4}	2M x 10^{-5}	M x 10^{-5}	2M x 10^{-6}
		Chlorotétracycline						
Longueur	Rac.	63, 86 ± 10, 84	7, 4 ± 3, 45	14, 36 ± 2, 33	16, 76 ± 2, 77	25, 1 ± 4, 62	28, 23 ± 4, 89	38, 46 ± 7, 68
	Tige	70, 13 ± 7, 24	18, 86 ± 4, 84	33, 96 ± 7, 56	35, 93 ± 9, 55	58, 13 ± 7, 34	60, 6 ± 10, 45	66, 43 ± 8, 23
Pds frais	Rac.	37, 70	5, 33	6, 83	10, 36	19, 50	16, 70	28, 66
	Tige	145	61, 20	84, 76	90, 20	120, 60	112, 60	125, 90
Pds sec	Rac.	2, 00	0, 50	0, 73	0, 73	1, 50	1, 36	1, 93
	Tige	11, 50	10, 23	10, 46	10, 43	10, 36	11, 00	9, 83
		Oxytétracycline						
Longueur	Rac.	56 ± 9	5, 26 ± 2, 21	12, 13 ± 2, 4	14, 66 ± 3, 58	18, 46 ± 3, 10	21, 1 ± 3, 20	26, 3 ± 4, 1
	Tige	66, 6 ± 9, 63	10 ± 1, 1	18, 00 ± 5, 4	23, 83 ± 3, 11	38, 36 ± 7, 6	46, 2 ± 7, 2	66, 7 ± 9, 46
Pds frais	Rac.	31, 73	3, 83	8, 23	8, 93	15, 00	15, 56	25, 40
	Tige	144, 53	47, 60	66, 20	78, 60	116, 40	110, 63	146, 33
Pds sec	Rac.	1, 76	0, 43	0, 80	0, 90	1, 36	1, 00	2, 40
	Tige	10, 20	10, 26	10, 50	11, 57	11, 63	10, 00	9, 86
		Tétracycline						
Longueur	Rac.	56 ± 9	3, 90 ± 1, 79	13, 90 ± 2, 96	17, 13 ± 2, 27	19, 10 ± 3, 90	25, 26 ± 3, 16	30, 10 ± 5, 82
	Tige	66, 60 ± 9, 63	9, 66 ± 2, 1	24, 90 ± 6, 22	25, 56 ± 6	48, 10 ± 9, 83	60, 00 ± 10, 5	62, 76 ± 7, 51
Pds frais	Rac.	31, 73	3, 63	7, 83	12, 30	12, 86	22, 70	29, 93
	Tige	144, 53	45, 93	63, 26	76, 10	115, 43	135, 43	119, 70
Pds sec	Rac.	1, 76	0, 50	0, 70	0, 76	0, 96	1, 36	1, 86
	Tige	10, 2	8, 13	9, 40	10, 1	9, 03	9, 60	9, 40

TRITICUM SATIVUM Lam. var. Vilmorin n° 27

		Témoin	M x 10^{-3}	2M x 10^{-4}	M x 10^{-4}	2M x 10^{-5}	M x 10^{-5}	2M x 10^{-6}
		Chlorotétracycline						
Longueur	Rac.	63, 25 ± 9, 48	6, 45 ± 1, 83	16, 45 ± 2, 74	18, 20 ± 3, 10	32, 10 ± 3, 68	34, 45 ± 4, 09	41, 00 ± 4, 45
	Tige	139, 85 ± 16, 7	27, 55 ± 4, 56	73, 00 ± 12, 2	95, 0 ± 11, 93	137, 5 ± 13, 39	121, 85 ± 9, 93	125, 3 ± 8, 44
Pds frais	Rac.	29, 36	2, 83	7, 46	10, 6	19, 56	20, 06	27, 73
	Tige	84, 5	23, 26	46, 16	58, 80	80, 56	82, 26	84, 57
Pds sec	Rac.	2, 73	0, 53	1, 06	1, 13	2, 30	2, 00	2, 76
	Tige	9, 03	2, 30	4, 93	6, 36	8, 93	8, 73	9, 00
		Oxytétracycline						
Longueur	Rac.	74, 9 ± 5	32, 2 ± 2	47, 8 ± 2, 3	67, 2 ± 2, 0	69, 5 ± 2, 6	91, 3 ± 3, 0	87, 0 ± 4, 7
	Tige	102 ± 3, 8	27, 5 ± 4, 4	78, 8 ± 8, 1	101, 0 ± 4, 5	109 ± 2, 5	115, 8 ± 2, 7	114, 3 ± 1, 9
Pds frais	Rac.	36, 26	15, 2	29, 76	38, 8	46, 13	47, 5	48, 73
	Tige	70, 06	30, 63	55, 63	65, 33	71, 43	75, 43	74, 93
Pds sec	Rac.	4, 06	2, 13	3, 30	4, 16	4, 63	4, 80	4, 81
	Tige	7, 96	3, 56	6, 46	7, 40	8, 03	8, 10	8, 46
		Tétracycline						
Longueur	Rac.	74, 9 ± 5	23, 0 ± 1, 2	38, 0 ± 2, 9	52, 5 ± 3, 1	85, 9 ± 8, 0	57, 3 ± 4, 3	81, 6 ± 5, 5
	Tige	102 ± 3, 8	22, 2 ± 2, 8	63, 7 ± 8, 8	93, 4 ± 9, 8	118, 1 ± 2, 8	110, 9 ± 12, 7	120, 35 ± 3, 2
Pds frais	Rac.	36, 26	19, 13	27, 2	40, 5	52, 53	40, 63	48, 20
	Tige	70, 06	27, 63	48, 80	64, 10	78, 40	71, 26	75, 53
Pds sec	Rac.	4, 06	2, 83	3, 60	4, 30	5, 90	4, 46	5, 26
	Tige	7, 96	3, 06	5, 66	7, 23	9, 26	8, 96	8, 76

ERVUM LENS L. var. verte du Puy.

		Témoin	$M \times 10^{-3}$	$2M \times 10^{-4}$	$M \times 10^{-4}$	$2M \times 10^{-5}$	$M \times 10^{-5}$	$2M \times 10^{-6}$
		Chlorotétracycline						
Longueur	Rac.	64, 65 ± 6, 3	15, 3 ± 1, 2	20, 2 ± 2, 9	32, ± 32	47, 3 ± 4, 5	48, 1 ± 4, 4	52, 9 ± 4
	Tige	66, 8 ± 3, 2	30, 3 ± 1, 4	42, 8 ± 2, 8	53, 1 ± 2, 6	62, 2 ± 2, 8	64, 2 ± 3, 3	63, 8 ± 2, 6
Pds frais	Rac.	44, 7	17, 5	22, 9	29, 9	39, 6	39, 6	39, 7
	Tige	45, 8	22, 4	30, 9	38, 2	44, 4	43, 9	44, 1
Pds sec	Rac.	4, 6	2, 2	3, 3	4, 2	4, 5	4, 6	4, 5
	Tige	3, 6	1, 6	2, 1	2, 5	3, 1	3, 2	3, 2
		Oxytétracycline						
Longueur	Rac.	64, 65 ± 6, 3	12, 6 ± 0, 6	21, 6 ± 1, 6	33 ± 2, 6	51, 9 ± 4, 4	60, 6 ± 5	55, ± 4, 3
	Tige	66, 8 ± 3, 2	17, 6 ± 2, 6	28, 9 ± 1, 6	44, 4 ± 2, 3	60, 5 ± 2, 3	62, 6 ± 3, 1	65, 45 ± 2, 4
Pds frais	Rac.	44, 7	13, 8	19, 7	33, 9	40	40, 2	45, 5
	Tige	45, 8	15, 6	23, 7	24	43, 4	45, 7	46, 7
Pds sec	Rac.	4, 6	1, 3	1, 8	2, 1	3	2, 9	3, 2
	Tige	3, 6	1, 7	2, 6	3, 5	4, 4	4, 5	4, 6
		Tétracycline						
Longueur	Rac.	64, 65 ± 6, 3	11, 7 ± 0, 5	19, 1 ± 1, 7	27, 2 ± 1, 3	38, 2 ± 4	77, 1 ± 9, 5	56, 8 ± 5
	Tige	66, 8 ± 3, 2	18, 65 ± 0, 9	30, 3 ± 1, 9	37, 9 ± 3	42, 8 ± 4, 1	73, 1 ± 3, 7	68, 1 ± 4, 7
Pds frais	Rac.	44, 7	22, 6	18, 8	21, 9	22, 8	42, 8	49, 5
	Tige	45, 8	16, 2	14, 1	26, 5	30, 1	49, 4	45, 6
Pds sec	Rac.	4, 6	2, 7	1, 7	1, 9	1, 9	2, 9	3, 5
	Tige	3, 6	1, 7	1, 4	2, 3	2, 6	4, 3	3, 7

PISUM SATIVUM L. var. Express Alaska.

	Témoin		Tétracycline 1 µg/ml		Tétracycline 10 µg/ml		Tétracycline 30 µg/ml	
	Probabilités à		Probabilités à		Probabilités à		Probabilités à	
	95 %	99 %	95 %	99 %	95 %	99 %	95 %	99 %
				Poids frais				
Tiges	594, 5 ± 39, 3	± 53, 1	535, 93 ± 53, 9	± 73	481, 76 ± 25, 4	± 34, 4	269, 63 ± 26, 4	± 35, 7
Racines	241, 1 ± 16, 0	± 21, 7	262, 5 ± 16, 7	± 22, 6	247, 5 ± 14, 8	± 20, 1	208, 60 ± 17, 1	± 23, 1
Cotylédons	325, 27 ± 20, 1	± 27, 2	322, 33 ± 15, 8	± 21, 3	311, 6 ± 18, 63	± 25, 2	378, 03 ± 21, 7	± 29, 3
				Longueurs (en cm)				
Tiges	18, 14 ± 1, 12	± 1, 58	16, 40 ± 1, 79	± 2, 42	14, 6 ± 0, 66	± 0, 89	6, 53 ± 0, 24	± 0, 32
Racines	10, 13 ± 0, 49	± 0, 66	10, 76 ± 0, 51	± 0, 70	10, 43 ± 0, 29	± 0, 40	9, 19 ± 0, 47	± 0, 63

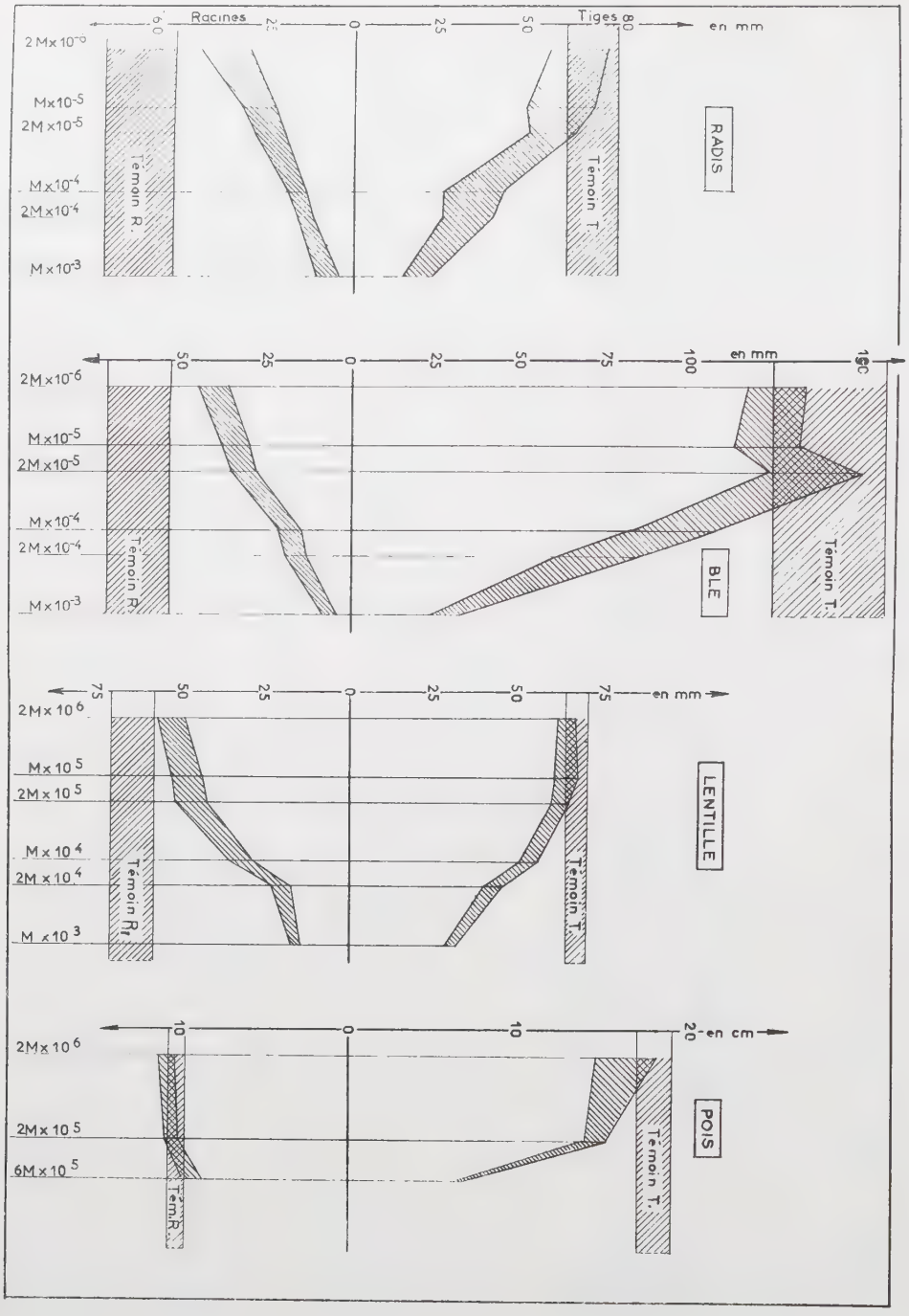


Fig. 1 - Activité de la Chlorotétracycline à différentes concentrations, sur les longueurs des tiges et des racines (écart type avec une probabilité de 95 %).

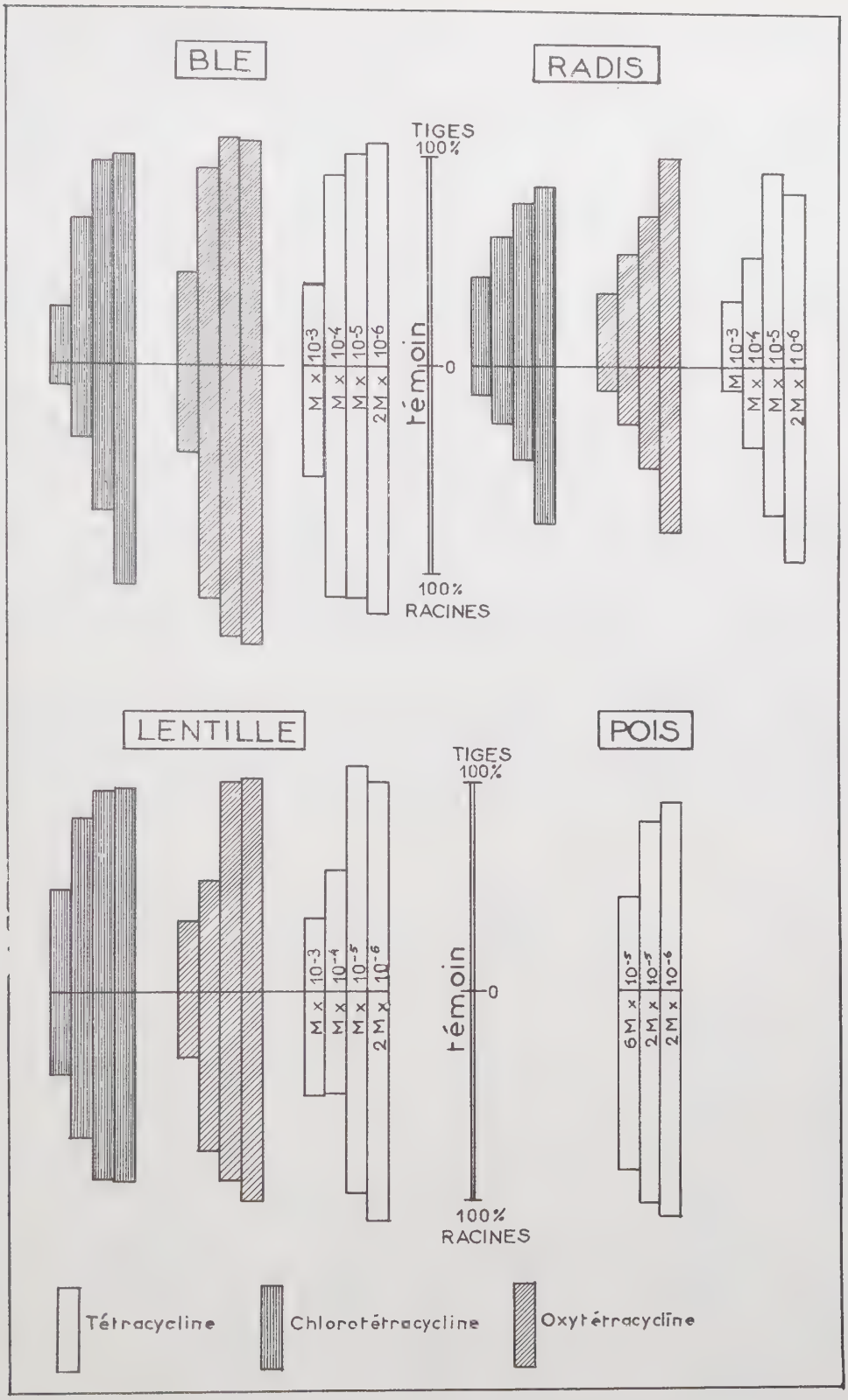


Fig. 2 - Pourcentage pondéral d'inhibition par rapport aux témoins.

Sur *Pisum sativum* L., variété Express Alaska, des expériences de même type que les précédentes ont été réalisées en utilisant un seul antibiotique, le chlorhydrate de Tétracycline aux doses de 1 μg/ml, 10 μg/ml et 30 μg/ml; ces concentrations correspondent sensiblement aux concentrations molaires respectives de $2M \times 10^{-6}$, $2M \times 10^{-5}$ et $6M \times 10^{-5}$. Les prélèvements sont faits au 11ème jour de culture (conditions de laboratoire identiques à celles des essais précédents); les différents organes sont séparés, mesurés et pesés individuellement.

Le tableau de la page 22 *(Pisum sativum)* indique les poids frais en milligrammes et les grandeurs en centimètres pour un individu.

D'autre part, les poids secs ont été faits sur des lots de 10 échantillons. Les racines latérales ont été séparées de la racine principale et ont été pesées séparément; le tableau ci-dessous donne les poids secs des organes de 10 échantillons exprimés en milligrammes (moyenne de 3 lots).

	Témoin	Tétr. 1 μg	Tétr. 10 μg	Tétr. 30 μg
Racines principales	84, 6	96, 2	97, 0	113, 2
Racines latérales	57, 7	56, 7	48, 9	29, 2
Rapport R. lat. /R. princ.	0, 68	0, 59	0, 50	0, 26
Tiges	444, 9	395, 5	351, 6	218, 4
Cotylédons	500. 4	464, 1	468, 7	993, 6

Enfin des lots traités par la Tétracycline à 30 μg/ml ont été prélevés les 4ème, 8ème et 11ème jours afin de suivre la croissance des plantules d'une part et la diminution des réserves des cotylédons d'autre part.

Le tableau suivant donne, également en milligrammes, les poids frais et secs de 10 échantillons

		Temps 0	4° jour	8° jour	11° jour
Poids frais					
Témoins	plantules	0	0, 582	3, 076	8, 356
	cotylédons	1, 760	3, 800	3, 590	3, 253
Tétracycline (30 μg/ml)	plantules	0	0, 517	1, 614	4, 782
	cotylédons	1, 760	3, 600	3, 690	3, 780
Poids secs					
Témoins	plantules	0	0, 060	0, 262	0, 587
	cotylédons	1, 535	1, 520	1, 054	0, 500
Tétracycline (30 μg/ml)	plantules	0	0, 068	0, 147	0, 361
	cotylédons	1, 535	1, 538	1, 210	0, 994

Interprétation des résultats.

Le choix de ces espèces nous a été dicté par la différence de qualité de leurs réserves cotylédonaires : amylacée (Blé), protidique et amylacée (Lentille et Pois), huileuse (Radis). Il serait cependant douteux d'établir d'ores et déjà une relation de cause à effet entre la nature des réserves et la sensibilité à l'action de l'antibiotique, tout d'abord parce que ces espèces se différencient par d'autres ca-

ractères que ceux qui ont guidés notre choix, et ensuite parce que le test de croissance est en lui-même insuffisant. Nous nous contenterons donc, actuellement, de mettre en évidence certains faits observés sans essayer d'en tirer une conclusion.

L'examen des graphiques (fig. 1 et 2) montre que les espèces expérimentées sont toutes sensibles à l'action des Tétracyclines et les effets observés consistent exclusivement en une inhibition de la croissance des tiges et des racines, inhibition qui se manifeste à partir de la concentration de $5Mx10^{-5}$, correspondant sensiblement à une concentration pondérale de 25 μg/ml. Le phénomene général d'inhibition est à peu près semblable pour les diverses espèces. Cependant, la comparaison des poids frais ou secs montre que le Radis paraît plus sensible à l'action des Tétracyclines que le Blé, la Lentille ou le Pois.

Le graphique des poids frais (fig.2) fait apparaitre que, d'une façon générale, la Chlorotétracycline est plus inhibitrice que les deux autres antibiotiques; le dérivé hydroxylé est un peu moins actif que la molécule de base, la Tétracycline.

Enfin, résultats et graphiques montrent que les tiges et les racines ne sont pas inhibées dans leur croissance à un même degré; l'action de l'antibiotique est apparente sur la racine à des dilutions plus grandes que celles qui provoquent un début d'inhibition de croissance des tiges de Radis, de Blé et de Lentille. Cette observation ne se confirme cependant pas sur le Pois; pour cette espèce, les poids ou les longueurs de racines ne mettent pas en évidence un effet phytotoxique de l'antibiotique sur cet organe; or l'aspect morphologique du système radiculaire est nettement différent suivant que la graine a été ou non soumise à l'action de l'antibiotique. Les racines principales apparaissent plus grandes dans les lots traités que dans les témoins; par contre les racines latérales se développent d'autant plus difficilement que la graine a été initialement trempée dans une solution plus concentrée d'antibiotique ; à titre d'exemple, des doses de 50 μg/ml de chlorhydrate de Tétracycline stoppent presque complètement l'apparition de ces racines qui sont réduites à de petites excroissances le long de la racine principale.

Si l'on sépare ces racines en deux lots, pesés séparément, le rapport $\frac{\text{Racines latérales}}{\text{Racine principale}}$ sera d'autant plus petit que l'antibiotique agira plus énergiquement : ce rapport de phytotoxicité montre que des doses initiales de 1 μg/ml provoquent déjà une action assez nette sur le système radiculaire du Pois, action parfaitement inapparente si l'on ne tient compte que des résultats de croissance, pondéraux ou dimensionnels.

B- Action particulière de l'antibiotique sur le développement des racines de Pisum en contact avec des solutions de celui-ci

L'expérience précédente montre que l'embryon mis en contact avec une solution de Tétracycline développera une racine principale qui peut être privée de racines latérales pour des doses convenables d'antibiotique. Dans cette série d'expériences, des racines normalement développées sont placées dans des solutions d'antibiotique à concentration variable.

Le protocole expérimental est le suivant : des lots de graines de *Pisum sativum*, var. Express Alaska, préalablement stérilisées sont mises en germinateur à l'obscurité pendant 48 heures. On prélève des séries de 10 germinations dont les plantules sont au même degré de croissance, c'est à dire sans tigelle et dont la racine atteint 20 mm. en moyenne.

Ce matériel est placé sur cristallisoir dans des nacelles permettant le passage des racines qui seules tremperont dans l'eau de la distribution additionnée de doses variables de Tétracyclines; les expériences sont faites en chambre climatisée dans les conditions déjà indiquées.

Résultats.

Les chiffres expriment, en milligrammes, les poids frais et les poids secs de 10 plantules.

Interprétation.

L'incorporation d'antibiotiques dans le milieu de culture bloque, aux doses étudiées, l'apparition des racines latérales du Pois et cette inhibition est manifeste encore à de faibles concentrations. Cette action, que nous avons déjà signalée dans un paragraphe précédent, est ici plus importante, ce qui ne saurait nous étonner puisque les racines sont en contact permanent avec la solution antibiotique. Quoi qu'il en soit ce matériel végétal et ce critère semblent dignes d'intérêt pour déterminer la phytotoxicité des antibiotiques ou éventuellement d'autres substances.

Les expériences montrent que, dans ces conditions, l'Oxytétracycline est moins toxique que les deux autres antibiotiques qui ont une activité à peu près identique.

Il faut également remarquer que la tige et la racine principales ont, malgré l'antibiotique, un développement presque normal.

		Tiges	Racines principales	Racines latérales	Rac. latér. / Rac. princ.
1 - Chlorhydrate de Tétracycline					
Témoin	P. f.	7924	1245	446	
	P. s.	487	87	50	0, 58
200 mg/l	P. f.	1399	1033	0	
	P. s.	203	100	0	0
40 mg/l	P. f.	4343	1200	10	
	P. s.	323	97	2	0, 02
20 mg/l	P. f.	5919	1324	35	
	P. s.	419	114	15	0, 13
4 mg/l	P. f.	8373	1349	267	
	P. s.	529	95	33	0, 35
2 - Chlorotétracycline					
Témoin	P. f.	5790	1089	329	
	P. s.	478	104	58	0, 56
200 mg/l	P. f.	3700	729	0	
	P. s.	341	85	0	0
40 mg/l	P. f.	4700	768	40	
	P. s.	413	68	8	0, 11
20 mg/l	P. f.	4908	1138	45	
	P. s.	413	99	13	0, 13
4 mg/l	P. f.	5522	1030	211	
	P. s.	444	79	30	0, 38
3 - Oxytétracycline					
Témoin	P. f.	6512	1388	1167	
	P. s.	516	94	78	0, 83
200 mg/l	P. f.	2226	825	0	
	P. s.	219	74	0	0
40 mg/l	P. f.	4225	341	79	
	P. s.	372	68	12	0, 18
20 mg/l	P. f.	5510	967	124	
	P. s.	465	80	15	0, 19
4 mg/l	P. f.	6884	1244	612	
	P. s.	555	92	45	0, 49

II - ACTION DES TETRACYCLINES SUR LES CULTURES DE TISSUS

L'emploi des cultures de tissus végétaux pour l'étude des problèmes de physiologie ou de biochimie végétales date de plusieurs années. Les recherches d'activité des antibiotiques sur un tel matériel, ont été engagées suivant deux voies différentes. La première est d'ordre phytopathologique, les travaux de cette sorte concernent en particulier le rôle éventuel qu'auraient certains antibiotiques sur les réactions de *Phytomonas tumefaciens* dans l'apparition des Crown-gall. La deuxième voie concerne les propriétés stimulatrices ou inhibitrices des antibiotiques au cours de la croissance des cultures.

Dans le premier cas nous citerons les travaux de De Ropp (1946-1949) et ceux de Nickell (1952). De Ropp cultive des souches de tissus tumoraux en présence de Pénicilline et de Streptomycine. Nickell obtient des effets de stimulation sur le tissu d'oseille, carencé en Thiamine et infecté par le "Wound tumor virus", avec des doses faibles (3×10^{-6}) de Bacitracine, d'Oxytétracycline, de Thiolutine et de Streptomycine.

Dans le deuxième cas les travaux sont beaucoup plus nombreux. La plupart des antibiotiques sont des inhibiteurs de croissance des tissus végétaux. Cette action fut constatée, en 1954 par Dahmen et Montschen sur des cals de Carotte traités par la Gliotoxine et la Viridine, en 1954 et 1958 par Nétien sur des cultures de parenchyme vasculaire de Topinambour avec la Streptomycine, le Chloramphénicol, l'Oxytétracycline et la Cyclosérine.

Sur le même matériel, Bertossi (1953) obtient des résultats identiques en utilisant la Dihydrostreptomycine. La croissance des cultures de tissus de Carotte *" in vitro"* est également inhibée par la Streptomycine et la Dihydrostreptomycine (Nétien, Carraz et Sotty - 1952).

Par contre certains antibiotiques, Streptomycine et Chloramphénicol (Nétien et Bertrand - 1954) et plus particulièrement la Pénicilline G (Camus et Lance - 1954-1955) accélèrent la croissance des cultures de parenchymes vasculaires de Topinambour; ces tissus ne peuvent se développer que si l'on ajoute au milieu de culture de l'acide β indolyl acétique. La Pénicilline G, incorporée à la place de l'hétéro-auxine à des doses allant jusqu'à 400 U.O./ml déclenche une intense multiplication cellulaire; lorsque le tissu contient l'hétéro-auxine, l'accroissement pondéral reflète uniquement les réactions de celle-ci. La Pénicilline ne modifie pas les réactions induites par l'hormone; il n'y a pas d'effets additif, synergique ou antagoniste.

Cette action de stimulation n'a pas pu être observée sur d'autres tissus; sur le Crown-gall de Scorzonère, il n'y a plus de stimulation aux doses faibles; une inhibition apparaît à partir de 800 U.O./ml. Le tissu de Carotte est insensible, de même que les méristèmes radiculaires de Topinambour et de Carotte, ainsi que la caulogénèse de fragments d'Endive cultivés en l'absence de l'hétéro-auxine.

Pour notre part, nous avons étudié l'action des Tétracyclines sur un certain nombre de cultures de tissus dont nous indiquerons les modalités au cours de ce chapitre.

A- Cultures de parenchymes vasculaires de Topinambour.

La variété "fuseau" *d'Helianthus tuberosus* L. que nous avons utilisée provient d'une culture continuellement entretenue au Jardin Botanique de la Faculté de Médecine de Lyon. Les fragments de tubercule de cette variété, à téguments rouges, ne peuvent être cultivés *"in vitro"* qu'en présence d'acide β indolylacétique; les cals verdissent au cours de leur développement.

Des petits cylindres de tissus de tubercule *d'Helianthus tuberosus* L., sont prélevés aseptiquement à l'aide d'un trocard, au cours de la période de repos hivernal; chaque explantat, d'un poids d'environ 130 mg, est légèrement enfoncé au centre de la surface d'un milieu de culture solide remplissant le fond d'un tube habituellement utilisé pour ces expériences.

Le milieu de base est une solution minérale, solution de Heller à laquelle sont ajoutés 50 g/l de glucose et 8/l de gélose.

Le milieu de Heller a la composition suivante :

Chlorure de potassium	0,75 g	
Nitrate de Potassium	0,60 "	
Sulfate de Magnésium	0,25 "	
Phosphate monosodique	0,12 "	
Chlorure de Calcium	0,07 "	
Perchlorure de Fer		1 mg
Acide Borique		1 mg
Sulfate de Zinc		1 mg
Sulfate de Cuivre ($,5H^2O$)		0,03 mg
Trichlorure d'Aluminium		0,03 mg
Chlorure de Nickel ($, 6H^2O$)		0,03 mg
Iodure de Potassium		0,01 mg
Sulfate de Manganèse ($,4H^2O$)		0,1 mg

pour 1 litre d'eau distillée.

En outre une adjonction d'acide 3-Indolyl-acétique à la dose de 1mg/litre sera faite pour une série de tubes.

Les antibiotiques sont ajoutés au milieu de chaque tube, après autoclavage et refroidissement jusqu'à une température de l'ordre de 40°C; les tubes sont agités de façon à bien homogénéiser le milieu qui sera ensuite solidifié par refroidissement complet. Les antibiotiques sont utilisés à concentrations molaires afin de comparer éventuellement leur activité avec celle d'antibiotiques d'un autre groupe que celui des Tétracyclines; la comparaison de l'activité des Tétracyclines utilisées est plus exacte mais nous aurions pu nous contenter dans ce cas des concentrations pondérales, les poids moléculaires des trois antibiotiques étant relativement voisins :

Tétracycline	444
Chlorotétracycline ...	478,5
Oxytétracycline	460

Les cultures sont placées durant un mois dans une salle climatisée à température de 22°C, recevant un éclairage à intermittence régulière de deux fois 8 heures sur 24, éclairage émis par des lampes Phytor L.F. 40.

Pour chaque concentration, la moyenne est calculée statistiquement après pesée de chaque cal (poids frais), (Heller).

Résultats

Deux séries d'expériences sont réalisées, l'une sur milieu de culture privé d'acide 3 indolyl-acétique, l'autre sur milieu en renfermant 1 mg/litre.

Les résultats sont exprimés en milligrammes et correspondent au poids frais moyen d'un cal. Les moyennes et les calculs statistiques ont été faits sur les poids de 10 échantillons. Afin de ne pas surcharger les tableaux nous n'indiquerons que la valeur moyenne sans les écarts-type.

	Poids frais initial de 1 cal	Poids frais final	Accroissement pondéral
1ère série : cultures poussant sur milieu renfermant en plus de l'antibiotique, de l'acide 3-indolyl-acétique à 1 mg/l.			
Témoin	128	936	808
Oxytétracycline à M x 10^{-4}	132	577	445
Chlorotétracycline -id-	109	84	-25
Tétracycline -id-	133	128	- 5
Oxytétracycline à M x 10^{-5}	131	849	718
Chlorotétracycline -id-	120	385	265
Tétracycline -id-	136	497	361
Oxytétracycline à M x 10^{-6}	130	1135	1005
Chlorotétracycline -id-	127	843	716
Tétracycline -id-	131	906	775
Oxytétracycline à M x 10^{-7}	133	1104	971
Chlorotétracycline -id-	132	1096	964
Tétracycline -id-	131	1186	1055
Oxytétracycline à M x 10^{-8}	131	888	757
Chlorotétracycline -id-	130	965	835
Tétracycline -id-	134	1212	1078
2ème série : culture sans acide 3-indolyl-acétique.			
Témoin	129	387	258
Oxytétracycline à M x 10^{-4}	129	235	106
Chlorotétracycline -id-	135	203	68
Tétracycline -id-	127	122	-5
Oxytétracycline à M x 10^{-5}	124	292	168
Chlorotétracycline -id-	136	304	168
Tétracycline -id-	132	231	99
Oxytétracycline à M x 10^{-6}	128	226	98
Chlorotétracycline -id-	135	257	122
Tétracycline -id-	128	389	261
Oxytétracycline à M x 10^{-7}	126	366	240
Chlorotétracycline -id-	130	394	264
Tétracycline -id-	129	360	231
Oxytétracycline à M x 10^{-8}	-	-	-
Chlorotétracycline -id-	128	423	295
Tétracycline -id-	129	300	171

Interprétation des résultats.

La culture de tissus de tubercule de Topinambour en présence d'acide indolyl-acétique se comporte de deux façons différentes suivant les doses de Tétracyclines avec lesquelles elle se trouve en contact : les concentrations inférieures à 0,5 mg/l provoquent une accélération de croissance et celles supérieures à 4 mg/l une inhibition.

Les concentrations inhibitrices sont variables avec les antibiotiques; les doses limites d'inhibition, sont, en concentrations pondérale et molaire

de 4,3 M x 10^{-7} ou de 0,20 mg/litre pour la Chlorotétracycline
de 8 M x 10^{-7} ou de 0,35 mg/litre pour la Tétracycline
de 5 M x 10^{-6} ou de 2,3 mg/litre pour l'Oxytétracycline

Dans les cals inhibés, le développement ne se produit qu'au niveau des tissus éloignés du milieu de culture; la croissance assez réduite devient apicale, alors que chez les témoins cette croissance est périphérique et basale; de plus les tissus sous-jacents inhibés se nécrosent.

Aux concentrations inférieures à Img et 0,1 mg/l d'antibiotiques, ceux-ci provoquent une augmentation de croissance, une accélération qui, malgré sa faible amplitude, est statistiquement significative.

Cette expérience donne également un résultat intéressant lorsque l'on compare entre elles les activités relatives des trois antibiotiques qui ne différent chimiquement entre eux que par l'adjonction d'un groupement sur la molécule de base représentée par la Tétracycline; l'addition en 5 d'un oxydrile diminue l'action phytotoxique de la molécule de base, au contraire un groupement chloré en 7 l'augmente.

L'examen des résultats dans la série de cultures faites sans apport hormonal montre qu'il n'y a pas de stimulation : ces composés ne peuvent remplacer l'hétéro-auxine dans le développement des tissus de Topinambour cultivés *"in-vitro"*. L'action toxique de ces antibiotiques se manifeste pour des doses sensiblement identiques à celles que nous avons déterminées dans la série de cultures faites sur milieu renfermant l'acide indolyl-acétique.

B- Cultures de tissus de *Parthenocissus tricuspidata* Sieb. et Zucc.

Le matériel utilisé est constitué par une culture de tissus de tige de Vigne-vierge, régulièrement entretenue au laboratoire depuis plusieurs années.

Le milieu de base est constitué par la solution minérale de Heller dans laquelle sont dissous :
30 grammes de saccharose
8 grammes de gélose, pour un litre
et de l'acide 3 indolyl-acétique à concentration de 3 x 10^{-7}

Les antibiotiques sont répartis aseptiquement dans les tubes de culture après autoclavage et refroidissement; le développement des cultures est réalisé dans les mêmes conditions que celles des cultures de tissus de Topinambour. Les ensemencements sont faits avec des fragments de souche. en forme de cubes, d'un poids frais moyen de 200 mg.

Résultats

Les valeurs données dans le tableau suivant correspondent au poids frais moyen d'un cal, en milligrammes. La moyenne est faite sur 10 prélèvements.

	Poids frais initial	Poids frais final	Accroissement pondéral
Témoin	177	1127	950
Oxytétracycline M x 10^{-4}	184	263	81
Chlorotétracycline -id-	214	208	-6
Tétracycline -id-	204	246	42
Oxytétracycline M x 10^{-5}	184	692	508
Chlorotétracycline -id-	214	760	546
Tétracycline -id-	204	773	569
Oxytétracycline M x 10^{-6}	195	1943	1748
Chlorotétracycline -id-	199	1582	1382
Tétracycline -id-	226	1433	1207
Oxytétracycline M x 10^{-7}	195	2085	1889
Chlorotétracycline -id-	199	1515	1316
Tétracycline -id-	226	2286	2060
Oxytétracycline M x 10^{-8}	177	1714	1537
Chlorotétracycline -id-	185	1345	1159
Tétracycline -id-	185	1372	1187

Interprétations des résultats.

A des doses égales ou supérieures à 5mg/l les trois antibiotiques provoquent une inhibition importante de la croissance des tissus de Vigne-vierge. Par contre à des dilutions de 0,5 mg/l et même à des concentrations plus faibles, ils se comportent comme des accélérateurs de croissance dans les conditions expérimentales précitées.

C- Cultures de tissus tumoraux de Crown-gall de *Scorzonera hispanica* L.

Le matériel est constitué par une souche régulièrement entretenue au laboratoire, souche qui nous a été gracieusement fournie par le Professeur Gautheret.

Le milieu de base est une solution de glucose à 50 g par litre dans le milieu minéral de Heller; le milieu est solidifié par addition de 8 g de gélose.

Cette culture se développe normalement sans qu'il soit nécessaire d'ajouter une auxine au milieu de culture.

Les fragments d'ensemencement ont un poids frais moyen de 130 à 150 mg. L'adjonction d'antibiotique est faite dans les mêmes conditions que précédemment.

Les cultures sont incubées en chambre de culture pendant deux mois environ.

Résultats : le poids frais d'un cal est exprimé en mg; il correspond à une moyenne faite sur 10 échantillons.

	Poids frais initial	Poids frais final	Accroissement pondéral
Témoin	95	323	228
Oxytétracycline M x 10^{-4}	134	272	138
Chlorotétracycline -id-	151	318	167
Tétracycline -id-	148	261	113
Oxytétracycline M x 10^{-5}	149	595	445
Chlorotétracycline -id-	131	439	307
Tétracycline -id-	171	695	523
Oxytétracycline M x 10^{-6}	120	505	384
Chlorotétracycline -id-	132	469	326
Tétracycline -id-	171	740	569
Oxytétracycline M x 10^{-7}	147	456	308
Chlorotétracycline -id-	128	466	338
Tétracycline -id-	188	740	552
Oxytétracycline M x 10^{-8}	123	562	439
Chlorotétracycline -id-	105	350	245
Tétracycline -id-	145	773	627

Interprétation des résultats.

Contrairement aux résultats obtenus avec la Pénicilline, les antibiotiques du groupe des Tétracyclines accélèrent les cultures de tissus tumoraux dès la concentration de 5 mg/l; la molécule de base, la Tétracycline apparait particulièrement active; une deuxième expérience fut reprise avec ce seul antibiotique en usant d'explantats plus volumineux, provenant d'une souche plus récente de Scorzonère. Les résultats exprimés ci-dessous confirment le pouvoir accélérateur de cet antibiotique.

	Poids initial (1 cal en mg)	Poids final	Accroissement	Pourcentage par rapport au témoin
Témoin	248	676	428	
M x 10^{-4}	227	218	-9	0 %
M x 10^{-5}	274	531	257	60 %
M x 10^{-6}	315	898	583	136 %
M x 10^{-7}	286	1330	1044	245 %
M x 10^{-8}	307	1172	865	200 %

D- Culture de tissus de racine de *Daucus Carota L.*

Ce matériel a été très utilisé dans l'étude physiologique et biochimique de la croissance; il constitue la première culture indéfinie *" in-vitro"*, dont la souche est perpétuée depuis de nombreuses années dans les laboratoires. (Souche normale provenant du laboratoire du Professeur Gautheret).

Dans les mêmes conditions expérimentales que celles indiquées précédemment (milieu de Heller, saccharose 30 g/l, gélose 8 g/l, acide 3 indolyl-acétique à 3 x 10^{-7}), nous avons cultivé cette souche durant un mois, en présence de Tétracycline.

Résultats

	Poids frais initial (en mg)	Poids frais final	Accroissement pondéral
Témoin	303	695	392
Tétracycline 100 µg/ml	292	364	72
-id- 10 µg/ml	310	571	261
-id- 1 µg/ml	297	785	488
-id- 0,1 µg/ml	245	635	390
-id- 0,01 µg/ml	295	695	380

Interprétations

Le tissu de Carotte est moins sensible à l'action de l'antibiotique que les tissus précédemment testés, et ceci aussi bien vis à vis des doses inhibitrices qu'accélératrices; néanmoins, à la dose de 1 µg/ml nous observons une accélération de croissance qui est relativement faible par rapport aux exemples précédents, accélération qui disparaît aux doses de 0,1 ou 0,01 µg/ml.

A des concentrations supérieures à 10 µg/ml, la Tétracycline se comporte en inhibiteur de croissance.

E - Conclusions

Les expériences réalisées sur quatre types de cultures de tissus montrent (fig.3) que ces espèces dans les conditions de vie sur milieux convenablement choisis, réagissent d'une façon différente vis à vis des antibiotiques, tout au moins lorsque l'on considère les propriétés accélératrices de ceux-ci :

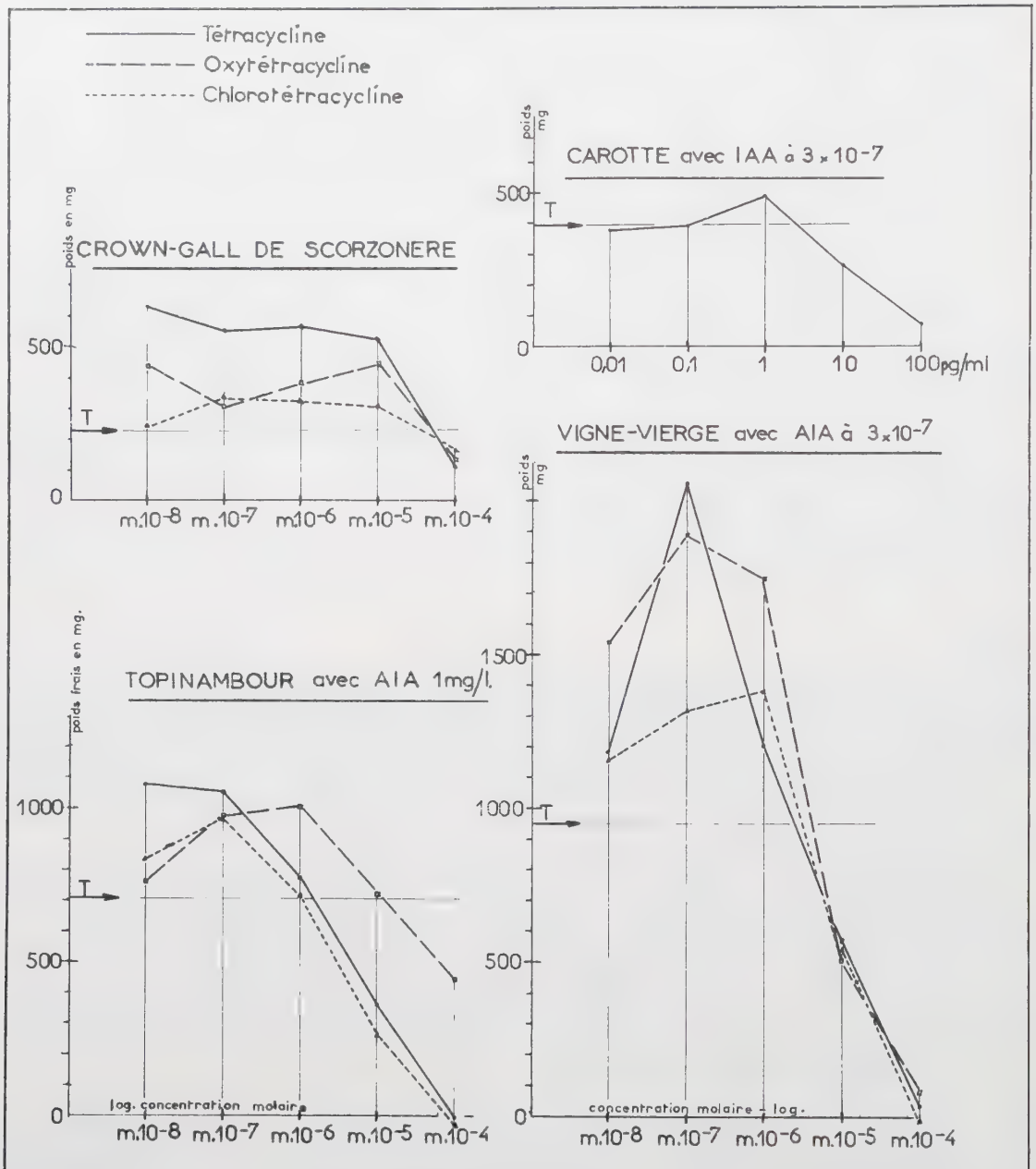
- le tissu de Carotte présente une faible accélération (120%) à la concentration de $M \times 10^{-6}$.
- les tissus de Topinambour et de Vigne-vierge sont, surtout ces derniers plus stimulés (145 et 180%) aux concentrations comprises entre $M \times 10^{-6}$ et $M \times 10^{-7}$.
- le tissu tumoral de Scorzonère est stimulé d'une façon remarquable, surtout par la Tétracycline; l'augmentation de croissance dépasse 200% dès la dose de $M \times 10^{-5}$ et se maintient à un niveau identique pour des dilutions plus grandes : de $M \times 10^{-5}$ à $M \times 10^{-7}$ et même $M \times 10^{-8}$.

Lorsque l'on considère les phénomènes d'inhibition, les tissus normaux réagissent d'une façon identique : l'inhibition est importante et rapide dès les doses à concentration supérieure à $3M \times 10^{-6}$. A $M \times 10^{-4}$ les croissances sont complétement stoppées: l'effet toxique provoque une nécrose des tissus sous-jacents en contact avec le milieu de culture.

Par contre le tissu tumoral de Scorzonère n'est inhibé dans sa croissance qu'avec des doses relativement plus importantes; à partir de $5M \times 10^{-5}$. A la dose de $M \times 10^{-4}$ l'augmentation pondérale est inférieure à celle des cals témoins mais reste encore, suivant l'antibiotique, comprise entre 50 et 73% alors que chez les autres tissus cette augmentation est nulle ou très voisine de zéro.

Enfin, si l'on considère les degrés d'activité entre les trois antibiotiques, la Tétracycline, en matière d'inhibition occupe une position intermédiaire entre l'Oxytétracycline et la Chlorotétracycline, ce dernier se montrant l'antibiotique le plus inhibiteur, le plus toxique.

Comme accélérateur de croissance, la molécule de base apparaît être la plus stimulatrice des trois antibiotiques, le dérivé chloré étant le moins actif.



Graphique de croissance des tissus en fonction de la concentration en Tétracyclines dans le milieu de culture.

Fig. 3 -

CHAPITRE II

EFFETS DES ANTIBIOTIQUES DU GROUPE DE LA TETRACYCLINE SUR L'HYDRATATION DES GRAINES ET DES TISSUS

Dans le chapitre intéressant la croissance nous avons donné un certain nombre de résultats susceptibles de mettre, le plus succinctement possible en valeur, les effets des Tétracyclines sur les phénomènes de croissance. En réalité un grand nombre de mesures ont été faites, plus particulièrement des pesées de substances fraîches et sèches lors des investigations biochimiques que nous relaterons ultérieurement.

Nous avons été frappé par les différences, régulièrement trouvées, dans le degré d'hydratation des graines ou des tissus traités par les Tétracyclines.

Nous donnerons dans les tableaux suivants les poids secs des prélèvements que nous avons faits aussi bien pour les mesures de croissance que pour les analyses chimiques. Ces résultats correspondent à des expériences faites avec la Tétracycline (chlorhydrate).

Les tableaux correspondent au poids sec en pourcentage par rapport au poids frais.

Radis (Tétracycline à 100 µg/ml ; la graine a été immergée 12 h. dans la solution).				
	20 h.	44 h.	68 h.	97 h.
Témoin Antibiotique	47 % 49, 7 %	40 % 43, 5 %	23 % 34, 2 %	13, 51 % 16, 7 %
Lentille (Tétracycline 100 µg/ml ; graine immergée).				
	20 h.	44 h.	68 h.	
Témoin Antibiotique	44, 8 % 43, 5 %	41, 4 % 40, 7 %	36, 25 % 38, 2 %	
Blé (Tétracycline 100 µg/ml ; graine immergée).				
	20 h.	44 h.	68 h.	
Témoin Antibiotique	62, 1 % 70, 6 %	53, 9 % 55, 1 %	39, 3 % 45, 7 %	
Pois (Tétracycline 30 µg/ml ; graine immergée).				
	0 j.	4ème j.	8ème j.	11ème j.
Cotylédons | Témoin Antibiotique	86, 6 % -id-	40 % 42, 6 %	29, 3 % 32, 8 %	15, 4 % 25, 3 %
Plantules | Témoin Antibiotique		10, 31 % 13, 15 %	8, 52 % 9, 11 %	7, 02 % 7, 55 %

Topinambour (Tétracycline 30 µg/ml dans le milieu de culture)					
	Tubercule	11ème j.	20ème j.	31ème j.	45ème j.
Témoin	17, 6 %	15, 5 %	12, 20 %	14, 83 %	14, 37 %
Antibiotique		17, 54 %	17, 51 %	20, 88 %	21, 6 %

Des doses plus faibles d'antibiotique provoquent également des différences sensibles dans les poids secs. Les cals de Carotte ont, suivant les concentrations en Tétracycline, les poids secs suivants :

Témoin : 9,3% ; Tétracycline 10 µg/ml : 11,11% et 100 µg/ml : 13%.

L'examen de ces résultats montre que les poids secs sont toujours plus élevés chez les individus traités; ce phénomène , général, intéresse tous les tissus ou tous les organes: cotylédons, tiges, racines ou tissus cultivés *"in vitro "*. Les végétaux traités sont moins hydratés que les témoins de même âge; ceci pourrait être interprété comme résultant d'un retard de croissance de l'espèce traitée par rapport à l'espèce témoin. Par exemple l'hydratation de la plantule de Pois soumis à l'action de l'antibiotique, est au 8ème jour inférieure à celle du témoin du 4ème jour.

Ceci n'apparaît pas comme une explication satisfaisante puisque dans les cultures de tissus (ex : Topinambour), l'hydratation augmente durant la croissance des cals témoins à partir du fragment de tubercule, alors que celle-ci diminue au contraire dans les séries se développant sur milieu nutritif renfermant l'antibiotique.

En résumé il apparait que ce trouble dans le régime hydrique des cellules soumises à l'action des Tétracyclines est un phénomène général.

CHAPITRE III

ACTION DES TÉTRACYCLINES

SUR LA RESPIRATION

Les travaux relatifs à l'action des antibiotiques sur les plantes ont montré que ceux-ci se conduisent dans la majorité des cas, comme des inhibiteurs de croissance. Ces constatations du phénomène global ont été parfois suivies de recherches plus précises au niveau de différents métabolismes. Parmi celles-ci, la mesure des échanges respiratoires, résultante des activités cataboliques, apparaissait comme l'une des premières expériences à entreprendre. Or, les travaux consacrés à cet aspect du problème sont peu nombreux.

Mancinelli (1957) traite des semences de Blé et de Trèfle avec des solutions de Pénicilline sodique G dès les premiers stades de germination; la mesure des échanges respiratoires est faite à l'appareil de Warburg. Cet auteur note une baisse de la respiration d'environ 30%, mais pour celà, il utilise des doses très élevées de Pénicilline.

Sinigaglia (1955) avait suivi les variations du phénomène respiratoire au cours de la germination de graines de Lupin en présence de Pénicilline, Dihydrostreptomycine et Chloromycétine à des concentrations comprises entre 4 et 50 mg/litre. Il note également un effet dépresseur.

Enfin Ventura et Hollanda (1956) indiquent que, sur des cultures de tissus de Carotte et sur des racines excisées de Maïs, la Dihydrostreptomycine, les Chloro et Oxytétracycline utilisés à doses relativement élevées (200 à 500 mg/l) ne provoquent pas de baisse importante de la respiration.

Dans ce chapitre, nous donnerons après le protocole expérimental, les résultats des échanges respiratoires des semences et plantules de Blé, Lentille et Radis.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les mesures ont été faites manométriquement suivant les techniques de Warburg; ces techniques sont parfaitement décrites par Umbreit, et nous ne ferons que résumer les conditions expérimentales.

Chaque expérience implique l'utilisation de 14 manomètres :

- 2 témoins thermobarométriques permettront d'évaluer les variations thermiques et surtout barométriques durant le temps d'expérience.

- 6 appareils manométriques serviront aux mesures des échanges respiratoires des plantules témoins, et
- 6 à celles des plantules traitées.

Les résultats de chacune des expériences correspondront ainsi à la moyenne des résultats calculés de 6 cuves, chacune de ces cuves renfermant un nombre égal de semences ou de plantules (de 3 à 5 suivant les intensités de respiration).

Dans chaque cuve, on introduit :

- 0,3 ml de potasse à 20% dans le puits central,
- 1 ml de solution tampon (0,025 M de phosphate monopotassique) glucosée à 2%,
- 3 graines ou plantules, de poids frais exactement déterminés, placées en contact de la solution tampon.

Les opérations sont ensuite poursuivies à 28°C suivant la technique classique de Warburg. Afin d'éliminer l'effet de la photosynthèse sur les échanges gazeux respiratoires, l'eau du bain dans lequel sont immergées les cuves, est teintée par du bleu de méthylène (150 mg pour 10 litres).

Mesures

L'atmosphère dans les cuves est l'atmosphère normale correspondant à celle de l'air ambiant; après équilibre thermique des cuves et du système manométrique, durant 15 minutes environ, le robinet assurant la communication des gaz avec l'extérieur est fermé. A partir de ce temps 0, les mesures seront faites toutes les 30 minutes jusqu'à 120 ou 180 minutes suivant l'état végétatif du matériel végétal.

Les résultats correspondent au nombre de millimètres cubes d'oxygène absorbé par 100 milligrammes de poids frais de matériel végétal; le volume est celui qu'occuperait le gaz à 0°C sous une pression de 760 mm de mercure. Le calcul des résultats tient compte non seulement des facteurs "Température ", " Pression", "Volume", mais également des coefficients de dissolution des gaz dans les liquides de la cuve. Le calcul est le suivant :

$$X_{O_2} = h \times \left(\frac{Vg \times \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_o} \right)$$

où : h : hauteur lue sur le manomètre en mm

Vg : volume du gaz de la cuve et du manomètre en ml.
T : température absolue au moment de l'expérience
V_f : volume du liquide de la cuve en ml.
P_o : pression standard : 760 mm de Hg .
α : coefficient d'absorption de Bunsen des gaz formés (exprimé en ml de gaz/ml liquide quand le gaz est à une pression de 760 mm de Hg à la température T)
X : 1 de Gaz , à 0°C sous 760 mm de Hg.

Quotient respiratoire

Celui-ci a été déterminé en utilisant la méthode directe de Warburg. Une série de graines ou de plantules respire en présence de potasse dans la chambre manométrique, l'autre série sans potasse; la potasse est remplacée ici par une quantité identique d'eau distillée.

La quantité déterminée par le système barométrique correspondra à la quantité d'oxygène absorbée par le matériel végétal; si l'on désigne par K_{O_2} les valeurs comprises dans la parenthèse de la formule précédemment indiquée, la quantité d'oxygène consommée sera :

$$X_{O_2} = h_{O_2} \times k_{O_2}$$

Dans le cas du système barométrique sans potasse, le changement de niveau du liquide manométrique est la résultante d'un abaissement de la pression dû à l'absorption de l'oxygène et de l'augmentation de pression dûe au rejet de l'anhydride carbonique; les changements de niveau dûs à l'absorption de l'oxygène d'une part et au rejet d'anhydride carbonique d'autre part étant respectivement :

$$h_{O_2} = \frac{X_{O_2}}{k_{O_2}} \quad \text{et} \quad h_{CO_2} = \frac{X_{CO_2}}{k_{CO_2}}$$

le changement de niveau dans le système sans potasse correspondra à la somme algébrique de ces deux valeurs, c'est à dire :

$$h = h_{O_2} + h_{CO_2} = \frac{X_{O_2}}{k_{O_2}} + \frac{X_{CO_2}}{k_{CO_2}}$$

d'où $X_{CO_2} = (h - h_{O_2})\ k_{CO_2}$

Les valeurs mesurées, soient h et h_{O_2}, k_{CO_2} et k_{O_2}, sont pour des conditions précises de température et de pression des constantes de l'expérience.

Le quotient respiratoire, $Q.R. = \frac{CO_2}{O_2}$ sera

$$Q.R. = \frac{X_{CO_2}}{X_{O_2}} = \frac{(h-h_{O_2})\,k_{CO_2}}{h_{O_2}\qquad k_{O_2}}$$

Le matériel végétal. Les espèces utilisées sont les suivantes :

Raphanus sativus L., var. Orléans
Triticum sativum Lam., var. Vilmorin 27
Ervum Lens L., var. Lentille verte du Puy

Radis - Les graines sont stérilisées, trempées pendant 16 heures dans la solution d'antibiotique (100 et 30 g/ml) ou dans l'eau de la distribution et étalées sur boîte de Pétri. Les prélèvements sont effectués aux heures suivantes :

- 20ème h. : la graine est hydratée
- 44ème h. : la racine est apparue
- 68ème h. : stade deux feuilles cotylédonaires.

Blé - Les conditions expérimentales sont identiques aux précédentes; les prélèvements sont faits aux mêmes heures et les stades de croissance sont les suivants :

- 20ème h. : graine hydratée
- 44ème h. : graine germée; une racine principale et deux racines latérales.
- 68ème h. : germination avec apparition du coléoptyle (longueur moyenne 5 millimètres).

Lentille - Cette espèce a été utilisée en place du Pois pour des commodités expérimentales; les graines de Pois sont en effet trop grosses pour pouvoir être placées dans les nacelles de l'appareil de Warburg. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles concernant le Radis.

Aux différents stades de prélèvement, la lentille se présente ainsi :

1er stade : graine hydratée
2ème stade : germination avec racines de longueur moyenne de 5 mm
3ème stade : racine et axe hypocotyle de 5 mm environ.

RESULTATS

Nous donnerons pour le Radis les résultats calculés complets des mesures faites aux 30ème, 60ème, 90ème et 120ème minutes. L'évolution de la respiration étant identique pour les autres espèces, nous n'indiquerons pour ces dernières que les résultats à la 120ème minute et ceci afin de ne pas surcharger les tableaux.

Radis - tableau général des résultats; les quantités d'oxygène absorbé sont exprimées en l pour 100mg de matériel végétal frais.

		1er stade	2ème stade	3ème stade
Témoin	30'	16, 1	44, 5	63, 5
	60'	-	95, 1	127, 8
	90'	41, 4	152, 0	210, 1
	120'	62, 4	182, 5	-
Tétracycline (100 µg/ml)	30'	19, 0	38, 5	52
	60'	-	81, 5	99, 7
	90'	51, 8	127, 2	156, 7
	120'	71, 5	153, 8	202
Témoin	30'	20, 9	49, 4	57, 7
	60'	41, 5	97, 1	115, 3
	90'	61, 4	154, 2	177, 8
	120'	84, 5	206, 4	-
Chlorotétracycline (100 µg/ml)	30'	20, 2	52, 6	51, 1
	60'	41, 5	103, 4	106, 4
	90'	63, 6	164, 2	160, 1
	120'	96, 5	206, 6	207, 7
Oxytétracycline (100 µg/ml)	30'	20, 9	49, 4	53, 4
	60'	42, 8	99, 3	110, 5
	90'	63, 1	148, 1	167, 8
	120'	90, 4	184, 0	217, 5
Témoin	30'	19, 7	49, 9	54, 7
	60'	49, 9	108, 4	115, 5
	90'	73, 4	170, 3	166, 2
	120'	100, 4	213, 3	-
Tétracycline (30 µg/ml)	30'	15, 9	49, 4	51, 9
	60'	43, 4	99, 3	109, 3
	90'	64, 0	158, 2	166, 0
	120'	89, 0	196, 6	216, 4

Blé - (Vilmorin 27) Quantité d'O_2 en µl consommée par 100 mg de végétal frais pendant 120 minutes.

	1er stade	2ème stade	3ème stade
Témoin	12, 3	54, 2	78, 0
Tétracycline (250 µg/ml)	10, 2	46, 2	67, 3
Pourcentage d'inhibition	- 12 %	- 15 %	- 13 %
Témoin	9, 7	38, 2	81, 9
Chlorotétracycline (250 µg/ml)	8, 8	31, 6	50, 5
Pourcentage d'inhibition	- 9 %	- 17 %	- 13 %
Témoin	11, 3	50, 8	79, 1
Oxytétracycline (250 µg/ml)	9, 8	44, 2	64, 1
Pourcentage d'inhibition	- 13 %	- 13 %	- 19 %

Lentille - (var. verte du Puy). Quantité d'O_2 en μl consommée par 100 mg de substance fraîche durant 120 minutes.			
	1er stade	2ème stade	3ème stade
Témoin	18, 5	57, 4	67, 7
Tétracycline (100 μg/ml)	19, 1	59, 0	57, 2
Pourcentage d'inhibition	+ 3, 1 %	+ 2, 8 %	- 15, 5 %
Témoin	16, 8	47, 1	73, 7
Chlorotétracycline (100 μg/ml)	19, 1	52, 6	62, 4
Pourcentage d'inhibition	+ 13, 6 %	+ 11, 5 %	- 15, 3 %
Témoin	20, 5	59, 8	74, 5
Oxytétracycline (100 μg/ml)	20, 3	60, 6	58, 1
Pourcentage	- 0, 5 %	+ 1, 3 %	- 22 %

Quotient respiratoire

Le quotient respiratoire est à tous les stades voisin de 1 pour le Blé et la Lentille. Par contre il évolue chez le Radis suivant les stades de croissance; voici les valeurs déterminées (moyenne de trois expériences) pour les plantes traitées et témoins :

	Q.R. à 20 h	Q.R. à 90 h
Témoin	1,27	0,76
Tétracycline 100 μg/ml	1,19	0,54

INTERPRETATIONS DES RESULTATS

Lorsque l'on trace les courbes de respiration en fonction du temps, pour chacune des expériences et dans les limites de sa durée, c'est à dire entre 0 et 120 minutes, on obtient toujours une droite. Autrement dit, la quantité d'oxygène consommée est exactement proportionnelle au temps. L'intensité de la respiration peut être définie par la pente de cette droite :

$$\frac{y\ \mu\ l\ O_2}{x \text{ minutes}}$$

Considérons les résultats complets des respirations du Radis aux trois stades. Chaque série d'expériences a été faite en présence d'un témoin, de telle sorte que trois mesures ont été faites avec le même matériel au même stade végétatif. Les pentes des droites correspondant aux trois témoins, aux trois stades sont les suivantes :

1er stade (20 h.)	0,51	0,70	0,83
2ème stade (44 h.)	1,52	1,72	1,77
3ème stade (68 h.)	2,33	2,00	1,84

Nous avons choisi, à dessein, le matériel végétal le plus irrégulier; le Blé et la Lentille ne présentent pas des écarts aussi importants. Ces chiffres nous montrent qu'au premier stade les écarts entre les valeurs déterminés sur trois témoins sont très grands (38% au maximum); ces écarts deviennent de plus en plus petits au fur et à mesure de la différenciation de la plantule ; au 3ème stade les écarts ne sont plus que de l'ordre de 23%.

D'autre part l'intensité respiratoire est définie par la pente de la droite; lorsque l'on suit l'évolution de cette valeur en fonction du temps, on voit que cette valeur croît rapidement du stade 0, au stade 1er puis 2ème (de la graine sèche au stade germination avec apparition de la racine) ; à partir du 3ème stade la valeur de la pente tend vers une constante.

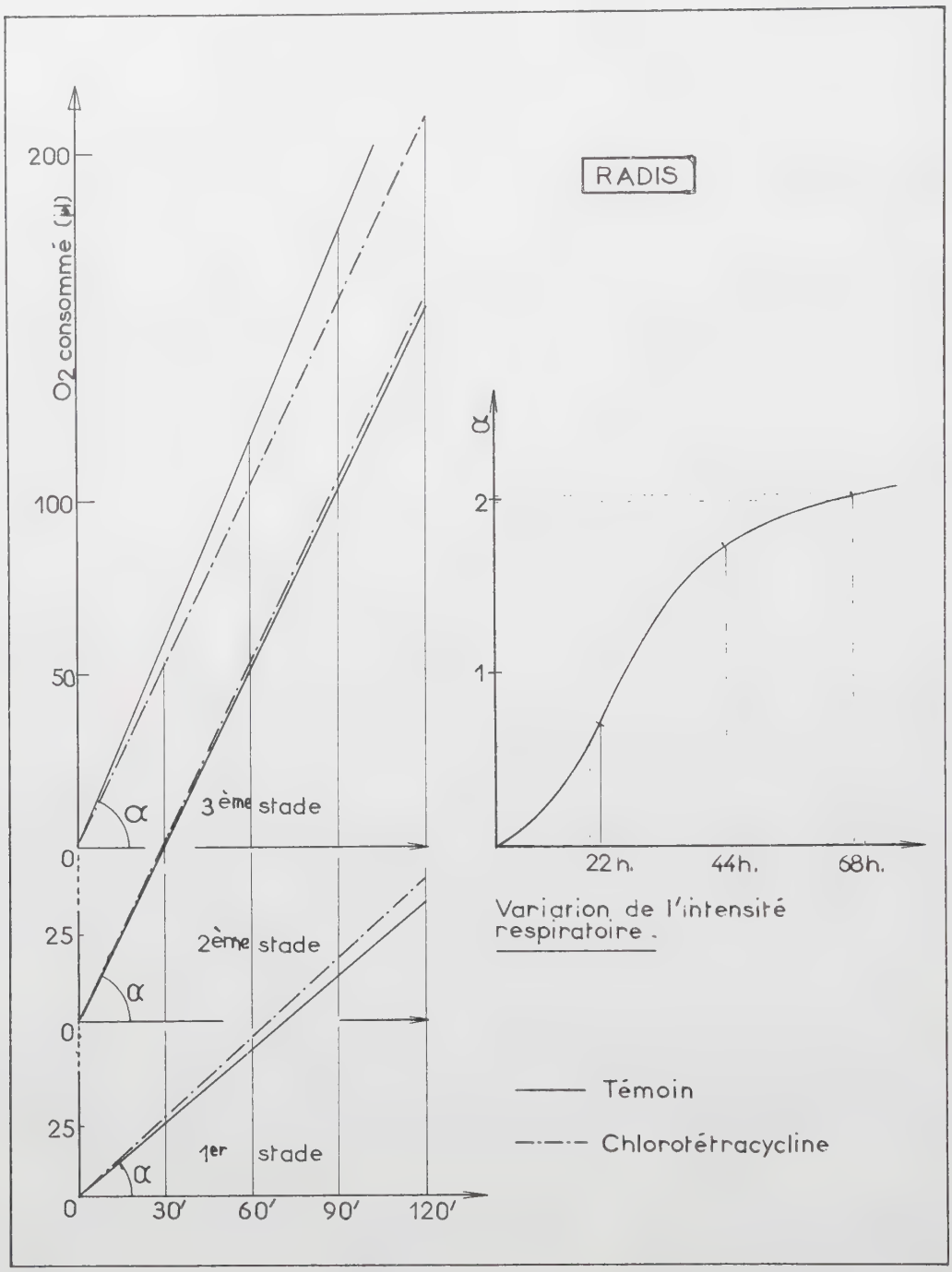

RADIS
O2 consommé (µl)
200
100
50
0
25
0
25
0
30'
60'
90'
120'
α
3ème stade
2ème stade
1er stade
α
2
1
22 h.
44h.
68h.
Variation de l'intensité respiratoire.
Témoin
Chlorotétracycline

Fig. 4 -

Sous forme de graphique, (fig.4) la variation de l'intensité respiratoire dans le temps, durant la germination et le début de croissance, montre que la respiration commence après que la graine ait atteint un certain degré d'hydratation; puis l'intensité de la respiration augmente rapidement jusqu'à la 44ème heure, temps au bout duquel la racine est apparue; cette intensité continuera à croître mais plus lentement jusqu'à ce qu'apparaissent les feuilles cotylédonaires (68 heures), moment à partir duquel la vitesse de consommation de l'oxygène deviendra à peu près constante.

Reportons nous au graphique " variation de l'intensité respiratoire " et supposons que les prélèvements n'aient pas été faits exactement à la 22ème heure et à la 68ème heure. Nous voyons que dans le premier cas tout prélèvement fait à 22 - 2 heures apporterait une modification de la pente de la droite caractéristique de l'intensité respiratoire dont les valeurs seraient comprises entre 0,58 et 0,82 . Au contraire, et dans ce même exemple théorique, des prélèvements réalisés 2 heures avant ou après 68 heures n'apporteraient qu'une modification assez faible dans la mesure de l'intensité respiratoire, ces variations étant les suivantes : $1,98 \leqslant \alpha \leqslant 2,02$.

Nous avons supposé une erreur possible concernant le moment du prélèvement, ce qui n'est pas le cas ; mais si nous pouvons contrôler ce facteur il était plus difficile d'assurer un critère au choix du matériel végétal surtout au stade graines hydratées; les jeunes plantules (3ème stade)peuvent être choisies en fonction de la dimension des racines et des tigelles et de leur aspect morphologique : ce matériel offrira ainsi les garanties d'une certaine homogénéité. Par contre, en ce qui concerne le choix des semences, la dimension ou le poids d'une graine ne conditionnent pas le moment de sa germination; le manque d'homogénéité et l'impossibilité de sélection de ce matériel végétal,pour les déterminations de l'intensité de la respiration dans le premier stade de l'expérience,expliquent les différences que nous avons notées et chiffrées précédemment. Ces erreurs, inhérentes au matériel végétal, ont été compensées au troisième stade de croissance parce que le choix est moins hasardeux, pouvant s' appuyer sur des critères qui permettent d'avoir des lots d'expérience beaucoup plus homogènes.

En résumé, les interprétations des résultats intéressant les premier et deuxième stades de germination et début de croissance, devront, pour les raisons que nous venons d'indiquer, être faites avec une certaine circonspection.

Pour développer cette étude, nous nous sommes placés dans les conditions les plus défavorables en prenant comme exemple le Radis qui est le matériel végétal le moins homogène. En ce qui concerne le Blé et la Lentille, les germinations des graines sont à peu près simultanées de telle sorte que les différences dûes au matériel végétal dans les mesures faites aux 20ème et 44ème heures ne sont pas aussi importantes que celles que nous avons trouvées avec le Radis.

Respiration du Radis.

Les résultats montrent qu'aux deux premiers stades, les respirations des graines traitées sont à peu près identiques à celles des témoins; de légères inhibitions apparaîtraient au premier stade avec l'Oxytétracycline et au deuxième avec cet antibiotique et le dérivé chloré. De plus les résultats montrent une légère stimulation au premier stade avec la Tétracycline. Mais en raison des réserves que nous avons formulées il ne semble pas possible de faire état d'une légère inhibition ou d'une stimulation . Par contre le troisième stade présente des résultats plus réguliers et ici nous remarquons une inhibition de la respiration nette avec la Tétracycline à 100 µg/ml, et moins apparente avec la Chlorotétracycline utilisée à la même concentration. La Tétracycline à 30 µg/ml ne possède plus d'effets, pas plus que l'Oxytétracycline.

En résumé, deux des trois antibiotiques, et à dose relativement élevée, provoquent une diminution de l'intensité respiratoire, diminution assez faible d'ailleurs, qui n'est vraiment apparente qu'au stade " feuilles cotylédonaires" de la croissance.

Respiration du Blé. Des essais préliminaires ont montré que les doses d'antibiotique de 100 µg/ml ne provoquaient pas chez les plantules traitées, des troubles sensibles dans leur respiration. Les expériences ont été faites avec des doses plus élevées de 250 µg/ml. A cette concentration les Tétracyclines diminuent l'intensité de la respiration et ces diminutions se manifestent à tous les stades de la germination et du début de croissance des plantules ; les pourcentages d'inhibition ne sont toutefois pas très importants (15% environ) compte tenu des doses élevées d'antibiotiques qui ont été utilisées.

Respiration de la Lentille. Durant les premières quarante heures de vie de la plantule les Tétracyclines utilisées aux doses de 100 μg/ml ne semblent pas avoir d'effets sur la respiration ou même paraitraient stimuler celle-ci (Chlorotétracycline); par contre l'intensité respiratoire diminue et, au troisième stade, c'est à dire vers la 70ème heure, celle-ci est inférieure de 15% par rapport à celle des plantules témoins.

Quotient respiratoire.

En ce qui concerne le Blé et la Lentille le quotient respiratoire ne semble varier ni sous l'effet des antibiotiques ni en fonction du temps. Par contre chez le Radis le coefficient est diminué sous l'action de la Tétracycline aussi bien chez la graine en germination que chez la plantule de 4 jours.

Le fait le plus intéressant est représenté par la variation de cette valeur dans le temps, bien que les cotylédons renferment des réserves huileuses, ce ne sont pas celles-ci qui seront les premières oxydées. Les quotients respiratoires supérieurs à 1 au début de la vie de la plantule, montrent que les premières substances oxydées sont des composés organiques riches en oxygène, certainement des acides organiques. Après avoir utilisé ces premiers substrats, la plantule oxydera les acides gras provenant de ses réserves cotylédonaires : le quotient respiratoire devient alors inférieur à 1 .

CHAPITRE IV

ACTION DES TÉTRACYCLINES SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ ET SUR LE MÉTABOLISME DES ACIDES ORGANIQUES AU COURS DE LA GERMINATION DE LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTULES OU DU DÉVELOPPEMENT DE CULTURE DE TISSUS "IN VITRO"

Le mécanisme d'action des Tétracyclines a déjà fait l'objet d'un certain nombre de recherches, recherches portant presque exclusivement sur des bactéries et notamment *Escherichia coli*. Hahn et Wisseman montrent que ces antibiotiques, à doses usuelles, bloquent d'une façon spécifique la synthèse protéinique *d'Escherichia coli* sans empêcher la poursuite d'autres synthèses.

L'emploi de bactéries comme matériel d'expérimentation pour l'étude du métabolisme azoté présente un certain inconvénient : chez ces organismes on ne trouve pratiquement pas d'accumulation d'amino-acides libres au cours de leur cycle végétatif. Au contraire, le matériel végétal renferme, à tout moment de sa vie et particulièrement lors de sa germination, des composés azotés solubles en quantité suffisamment importante pour qu'il soit possible d'apprécier, dans la composition de ces éléments, des différences qui pourraient être dues à l'effet antibiotique.

Si l'on trouve un grand nombre de travaux intéressant l'action de ces antibiotiques sur les végétaux, la plupart de ceux-ci sont envisagés sous l'angle inhibiteur et accélérateur de croissance ou essai de phytotoxicité; quelques auteurs ont envisagé des actions particulières au niveau de certains processus enzymatiques. En ce qui concerne l'action des Tétracyclines sur certains métabolismes, nous ne connaissons que fort peu de travaux; Zelinkova a cité incidemment une accumulation d'alanine dans les plantules de Pois traitées par la Tétracycline.

Šorm, Šormova, Zelinkova et Grŭndberger ont publié de nombreux travaux sur le mécanisme d'action du d-Chloramphénicol sur les végétaux. Bien qu'il ne s'agisse pas spécialement du groupe d'antibiotiques qui nous intéresse, ces travaux ont particulièrement retenu notre attention car, nous l'avons déjà indiqué, il existe une parenté d'action entre le chloramphénicol et les tétracyclines, antibiotiques avec lesquels il a même été possible d'obtenir des résistances croisées.

Ces auteurs ont noté que le Chloramphénicol provoquait une accumulation d'alanine et d'acide pyruvique (Zelinkova et Šorm - 1955), que l'effet était variable non seulement suivant les espèces végétales mais également en fonction de la nature des réserves de la graine, ces variations apparaissant sur la croissance et sur les troubles qui affectent la chlorophyllogénèse (Šorm, Zelinkova et Šormova-1954). Šormova et Šorm (1954) indiquent que l'action antibiotique ne doit pas être recherchée au niveau du métabolisme des acides nucléiques, celui-ci n'étant pas sensiblement affecté. Enfin, d'autres collaborateurs de Šorm, Grŭnberger et Škoda (1955) notent une inhibition de la formation de certains enzymes chez *Escherichia coli*.

Les cultures de tissus végétaux *"in vitro"* ont été utilisées dans l'étude de certains métabolismes particuliers, mais ici également peu de travaux ont été publiés concernant les troubles provoqués au niveau du métabolisme azoté par les antibiotiques. Récemment, Ménagé (1959) indique que dans des tissus de Topinambour cultivés sur milieu nutritif sans auxine, la Pénicilline provoque des anomalies importantes dans le métabolisme des amino-acides. En ce qui concerne l'action des Tétracyclines, nous ne connaissons aucun travail publié dans cet ordre d'idées.

Nous envisagerons dans ce chapitre l'effet du chlorhydrate de Tétracycline sur les plantules de Radis, de Pois et sur la culture *" in vitro"* de parenchymes vasculaires de Topinambour. Nous exposerons tout d'abord les techniques d'analyses et de dosages utilisées, puis les résultats concernant les amino-acides et les acides organiques, résultats que nous essaierons enfin d'interpréter.

I - TECHNIQUES D'EXTRACTION, SEPARATION, CARACTERISATION ET DOSAGES DES ACIDES AMINES ET ORGANIQUES.

A - Extraction des amino-acides et des acides organiques.

Nous avons utilisé deux méthodes d'extraction, l'une à chaud, l'autre à froid, suivant que nous désirions extraire les amino-acides ou les amino-acides et les acides organiques.

- Extraction à chaud.

Le matériel végétal est fixé dans l'alcool bouillant, tout au moins en ce qui concerne les tissus cultivés ou les plantules, puis broyé au mortier en présence de sable ou plus simplement de verre brisé. Le broyat est successivement épuisé à chaud à une température de 80°C, par de l'alcool éthylique à 50° puis par l'eau distillée. Deux extractions sont faites avec chacun des solvants. Les liqueurs sont réunies, puis mélangées au liquide alcoolique de fixation, ramenées à un titre alcoolique de l'ordre de 40° et filtrées. Le filtrat sera traité par des résines échangeuses d'ions.

Le poids total des liquides utilisés pour une telle extraction est à peu près de 50 fois celui du matériel frais à extraire.

Cette technique est peu délicate; les acides organiques, en particulier, sont soumis à une température trop élevée qui peut provoquer une altération importante de certains acides, notamment des acides cétoniques. Les amino-acides, par contre, présentent une stabilité suffisante de telle sorte que cette méthode d'extraction n'a été utilisée que pour l'étude de ces seuls composés.

- Extraction à froid.

Le matériel végétal est réfrigéré dès son prélèvement soit dans un réfrigérateur, soit dans un récipient placé dans un bain d'alcool ou d'acétone refroidi par de la neige carbonique. Un premier broyage est fait à l'aide d'un broyeur à pales d'acier Inox; le récipient dans lequel est placé le matériel à broyer est réfrigéré par un bain de saumure ou par le mélange réfrigérant précédant. Le broyat est ensuite soumis à une homogénéisation avec l'appareil de Potter-Elvejhem; l'échauffement dû aux frottements créés par cette opération est faible si l'on prend soin d'opérer assez rapidement et surtout si l'on place dans le pot de l'homogénéiseur un broyat bien réfrigéré. Cet homogénéisat sera directement traité par les résines échangeuses en chambre froide ou dans un réfrigérateur à une température de 4°C. Cette technique présente un avantage manifeste sur la précédente en ce qui concerne surtout l'isolement des acides cétoniques où l'altération par la chaleur est réduite au minimum.

B- Séparation des groupes Amino-acides et Acides organiques.

Extraits ou broyats sont traités d'abord par une résine type polystyrènes sulfonés, la Permutite C 50 D (Philips et Pain), 20-50 mesh. La résine est régénérée par l'acide chlorhydrique normal et lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ait un pH égal ou supérieur à 5,4 ; conservée sous eau, en flacons bouchés, la résine régénérée est lavée avant chaque emploi.

Résines anioniques. Deux résines ont été employées qui ont donné des résultats identiques :

- Dowex I, 20-50 mesh, à groupements actifs de forme de $-N^{+}\equiv(CH_3)_3$

- Permutite A 300 D, de grains de même taille que la précédente et à groupement actif $-N^{+}_{\equiv}(CH_3)^2=(C_2H_4\text{-}OH)$; cette résine est identique à Dowex II.

Ces résines sont régénérées par une solution de soude normale et lavées abondamment à l'eau distillée bouillie ou décarbonatée avant l'emploi lorsqu'elles ne sont pas utilisées rapidement après leur régénération.

Séparation -

Les extraits hydro-alcooliques sont passés sur Permutite C 50 D placée dans une colonne à chromatographie. Le débit est réglé de façon à recueillir de 20 à 30 gouttes d'effluent à la minute. Après lavage à l'eau distillée, la colonne est soumise à l'élution par une solution d'ammoniaque normale (plus commodément une solution au 1/10 d'ammoniaque commercial; cette dilution correspond à peu près à la normalité). La fin de l'élution est facilement repérée grâce à la présence de composés flavonoïdes qui restent fixés sur la résine et ne sont pas complètement éliminés par le lavage de celle-ci après le passage de l'extrait; ces composés jouent un rôle de réactif indicateur : l'éluat présente une fluorescence jaune verdâtre lorsqu'il devient alcalin, c'est à dire lorsque la résine est saturée d'ions NH_4^{+}, en fin d'élution.

Certains extraits de matériel riche en amidon (cotylédons du Pois) ou en inuline (tissu de Topinambour) diminuent d'une façon assez importante la perméabilité de la colonne à chromatographie; il est nécessaire de pratiquer un lavage suffisamment abondant pour "décrasser" la résine avant de la soumettre à l'élution. Ces macromolécules diminuent la capacité d'absorption des résines, même après lavage et régénération, de telle sorte que nous n'avons pu les utiliser ensuite avec satisfaction que deux ou trois fois.

En ce qui concerne le traitement des homogénéisats, la fixation des anions et des cations est conduite d'une façon un peu différente. A l'homogénéisat, laissé dans un bécher au réfrigérateur, on ajoute une quantité déterminée de résine cationique; la résine est remise en suspension de temps en temps de façon à favoriser la fixation des amino-acides. Le surnageant est ensuite décanté dans un deuxième bécher sur résine anionique. La première résine est lavée plusieurs fois de façon à entraîner toutes les particules et ceci jusqu'à obtenir une dernière eau de lavage très claire; les eaux de lavage sont réunies avec le surnageant dans le deuxième bécher.

Le traitement par la résine anionique sera fait de la même manière.

Les deux résines , lavées, sont transvasées chacune dans une colonne à chromatographie et éluées; la colonne cationique est éluée par une solution N/I d'ammoniaque.

L'élution de la résine anionique peut être conduite de deux façons différentes. La première élution que nous avons utilisée était faite par une solution d'acide chlorhydrique normal; les acides élués sont ainsi obtenus sous forme acide libre. L'excès d'acide chlorhydrique doit être chassé, en même temps d'ailleurs que sera concentré l'éluat en vue de son utilisation ultérieure. Bien que toutes les opérations aient été jusqu'alors conduites à une température de 4°C, la nécessité de cette concentration, même dans les meilleures conditions, c'est à dire sous vide à une température de 30°C, provoque une perte en acides que G.Jolchine évalue à 30%.

Aussi avons nous utilisé la technique d'élution proposée par Bové et Raveux qui est la suivante : Les acides organiques sont élués par une solution de carbonate d'ammonium à 10% (600 ml. pour un broyat correspondant à 100 g de matériel végétal); l'élution est terminée par passage sur la colonne de 40 ml de soude normale. Les acides ne sont plus à l'état libre mais à l'état de sels d'ammonium et de sodium. La concentration sous vide dans les conditions précédentes est rendue possible sans altération sensible des acides. La distillation peut être réalisée à 27°C sous un vide de 2mm de mercure. La concentration est poussée jusqu'à un volume de 10 à 15 ml; dans ces conditions le carbonate d'ammonium est décomposé et il ne reste pratiquement plus dans la solution concentrée que les sels de sodium des acides organiques; ceux-ci sont rendus à l'état d'acides libres en traitant la solution saline par une quantité déterminée de résine cationique. La solution acide réduite ainsi à un volume de 10 à 20 ml est concentrée à sec dans une cloche à vide sur "Actigel"; la cloche à vide est laissée au réfrigérateur pendant le temps de cette dessication.

C- Acides aminés - Analyse et dosage.

L'éluat ammoniacal est concentré sous vide, à sec; le résidu est repris par une quantité d'eau distillée ou d'alcool à 50° égale en volume au poids de substance fraîche qui a servi de prise d'essai. Cette solution est analysée par chromatographie bidimensionnelle.

a) Analyse par chromatographie de partage sur papier.

1/ Papiers : " d'Arches 302 et 304 " : ce papier donne de bons résultats si l'on a soin de respecter toujours les mêmes sens de texture du papier avec les différents solvants.

2/ Solvants.
1er solvant : Butanol - acide formique - eau (75 - 15 - 10) ; ce solvant est préparé extemporanément par mélange de Butanol (75 vol.) et d'une solution d'acide formique à 60% dans l'eau distillée (25 vol.) La phase vapeur dans la cuve à chromatographie correspond à la tension de vapeur, dans les conditions de développement, d'une solution aqueuse à saturation de la phase solvante.
2ème solvant : phénol - eau (80-20). Ce solvant doit être préparé souvent en petite quantité pour éviter l'oxydation de la solution phénolique; le phénol est distillé à 181-182°; au distillat encore chaud on ajoute 25% d'eau distillée; le phénol aqueux absolument incolore est conservé en flacons bruns, bouchés émeri, à l'abri de la lumière.

3/ Chromatographie : descendante, en cuves Shandon à température 20-22°.
Passage du 1er solvant pendant une dizaine d'heures. (dans la journée)
Passage du 2ème solvant (phénol) : 15-18 heures (une nuit).

Après l'évaporation du solvant butanolique, la feuille est découpée parallèlement au front de ce solvant à quelques centimètres au-dessus de celui-ci, ceci afin de permettre une descente régulière du 2ème solvant; en effet la solution acide de butanol entraîne des éléments minéraux contenus normalement dans le papier; ces éléments se concentrent dans la zone frontale du 1er solvant. Au cours de la deuxième opération le solvant phénol descendra parallèlement au front butanolique; l'accumulation d'éléments minéraux au niveau de ce front provoque en cet endroit un ralentissement de la migration du phénol de telle sorte que le front phénolique n'est pas rectiligne mais courbe avec une pointe très marquée au niveau du front du premier solvant. L'identification des amino-acides à Rf élevés dans les deux solvants serait ainsi rendue beaucoup plus délicate. (Leucine et iso, phénylalanine, méthionine)

Avant de découper la zone frontale il est bon de mesurer la première distance frontale et de s'assurer de l'absence de spots dans la partie éliminée.

Les chromatogrammes développés sont séchés dans un courant d'air chaud à 25 - 30°C.

4/ Révélation des chromatogrammes.

Les chromatogrammes sont immergés rapidement dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2% légèrement acidifiée par l'acide acétique (0,5 ml pour 100). Pour les appréciations quantitatives nous utilisons une solution un peu plus concentrée en ninhydrine (0,5%). La révélation est faite à température de 60-70°C lorsqu'il s'agit d'une caractérisation rapide, ou à température du laboratoire à l'obscurité pendant 24 h. lorsque nous désirons comparer les quantités relatives d'acide aminés provenant de l'extraction de plusieurs échantillons. Cette méthode de révélation est générale, révélant la plupart des amino-acides en bleu-violacé à l'exception de quelques uns tels la proline (jaune), l'hydroxyproline (jaune orangé) la cystine et le glutathion (brun rosâtre), la lysine (gris), la phénylalanine (bleu) et l'asparagine (brun gris).

Aussi avons-nous fait appel parfois à des réactions colorées plus spécifiques.

Isatine en solution à 0,2% dans l'éthanol ou le butanol acidifié par l'acide acétique (4%). Révélation en 24 h.; à température du laboratoire ou 1/2 h. à 70°C :

proline : coloration bleue
Hydroxyproline : coloration bleu pâle

Réaction de Sakaguchi adaptée par Acher et Crocker à la révélation de l'arginine et des composés guanidiques sur un chromatogramme. Une pulvérisation est faite avec une solution alcoolique d'αnaphtol (0,01 %) et d'urée (5 %) à laquelle sont ajoutées extemporanément 5 pastilles de soude pour 10 ml de solution. Après séchage, une deuxième pulvérisation d'hypobromite de sodium (2g de Br pour 100 ml de NaOH à 5%) fait apparaître *l'arginine* en rouge.

α nitroso- β naphtol - Après pulvérisation d'une solution éthanolique d'α nitroso- β naphtol (0,1%) et séchage, une deuxième pulvérisation d'acide nitrique à 10% suivie d'un chauffage pendant 3 minutes à 90°C fait apparaître la *tyrosine* en rouge.

Dialdéhyde ortho-phtalique est utilisé en solution fraîchement préparée dans l'acétone (0,2%). Sur le chromatogramme immergé dans cette solution, séché et chauffé 10 minutes à 50°, *le glycocolle* présente une tache verte; l'*histidine* et le *tryptophane* présentent des taches jaunes.

5/ Détermination des amino-acides.

Certains spots sont aisément déterminés par leurs réactions colorées, leur Rf ou par comparaison avec des chromatogrammes témoin. Pour faciliter ces comparaisons les chromatogrammes sont reproduits sur papier-calque et les valeurs de Rf représentés par des droites en quadrillage. En cas de doute quant à la caractérisation d'un des acides, l'addition sur le dépôt de l'échantillon analysé, de l'amino-acide permettra de définir l'identité ou non de celui-ci avec le témoin.

b) Dosage des acides aminés.

Certains amino-acides ont pu être dosés, directement dans la solution, grâce à des réactions spécifiques; c'est le cas de l'arginine, de l'histidine et de la tyrosine. Les autres acides ont été dosés après séparation chromatographique unidimensionnelle ou bi-dimensionnelle par comparaison des spots avec ceux de chromatogrammes témoin ou, après élution, par dosage colométrique.

1/ Dosages dans la solution

Arginine. Méthode décrite par Mc Pherson utilisant la réaction de Sakaguchi :

- solution d'arginine en concentration comprise entre 0,02 et 0,16 mg complétée à 5 ml par de l'eau distillée.
- 1 ml de potasse à 10%
- 2 ml d'une solution d'α naphtol à 0,1% dans l'éthanol
- 1 ml d'une solution d'urée à 5% dans l'eau distillée

Après agitation vigoureuse;

- 2 ml d'hypobromite de Potassium (2 g de Brome dans 100 ml de potasse à 5%) ajoutés avec une pipette à écoulement rapide ;
  après cette addition le tube est aussitôt agité vigoureusement.
- eau distillée : 14 ml de façon à compléter à 25 ml.

Les lectures sont faites au photomètre de Meunier avec un filtre vert n°52.

Histidine. Méthode, décrite par Mc Pherson, utilisant la réaction de Pauli.

- solution d'histidine en concentration comprise entre 0,02 et 0,10 mg complétée à 5 ml par de l'eau distillée.
- 1 ml d'acide sulfanilique (1% dans acide chlorhydrique normal)
- 1 ml de nitrite de sodium (5% dans l'eau distillée)

Après mélange et repos durant 5 minutes,

- 3 ml de carbonate de sodium (20% dans l'eau distillée) ajoutés avec une pipette à écoulement rapide; agitation pendant 10 secondes puis rapidement
- 10 ml d'alcool éthylique à 20%

Le tube agité en même temps que refroidi sous un courant d'eau.

Lectures au photomètre de Meunier, filtre n° 52.

La tyrosine donne également une forte coloration par diazotation. Il convient de séparer cet amino-acide; la séparation est faite par chromatographie sur papier en utilisant le solvant butanolique. La solution d'amino-acides est déposée en une ligne de 10 cm; de part et d'autre on dispose des solutions témoin de ces deux acides aminés afin de faciliter le découpage de la bande renfermant l'histidine qui sera élué, par du méthanol. Le dosage sera fait sur cet éluat évaporé à sec. Les acides aminés élués en même temps que l'histidine n'interfèrent pas sur la réaction (cystine, lysine, asparagine, arginine).

Dans nos conditions d'expérience il est nécessaire de déposer au départ des volumes de 0,2 à 0,4 ml de solution afin de se trouver dans les limites de la gamme étalon.

Tyrosine. Zalta, et Khouvine dosent colorimétriquement la tyrosine en utilisant la réaction colorée, rouge cerise, que donne cet amino-acide avec l'α nitroso-β naphtol en milieu nitrique et en présence d'ions phosphate.

Technique

- solution de tyrosine en concentration comprise entre 0,005 et 0,025 mg
- acide chlorhydrique concentré : 0,5 ml.
- acide phosphorique pur : 0,25 ml.
- acide nitrique dilué au 1/10 : 0,10 ml.
- solution d'α nitroso-β naphtol à 0,1% : 0,50 ml.

Après mélange, les tubes sont portés au bain-marie à 70°C pendant 4 minutes; après refroidissement, le volume est complété à 5 ml par une solution d'acide chlorhydrique au 1/2.

Lecture est faite au photomètre de Meunier avec filtre vert n° 52.

2/ Dosages sur le chromatogramme

- Par comparaison avec des chromatogrammes témoin.

Une solution témoin renfermant l'ensemble des amino-acides à titrer est faite de telle sorte que un µl renferme 0,3 µg de chacun des acides. Par dépôts successifs de I µl de cette solution, on prépare 6 chromatogrammes qui après développement et révélation à la ninhydrine pendant 24 h. à température du laboratoire, présenteront des taches correspondant à des doses successives de 0,3 0,6 à 0,9 .... 1,8 µg pour chacun des amino-acides. L'intensité de coloration et l'importance des taches des amino-acides à doser seront comparées à ces chromatogrammes étalons.

Cette méthode est approximative; ses défauts sont nombreux.

- nécessité de réaliser tous les développements dans des conditions identiques, chose difficile lorsqu'il faut utiliser une vingtaine de chromatogrammes.

- certains amino-acides sont en faibles quantités dans la solution à doser, d'autres en quantité importante, de telle sorte qu'il faut faire parfois quatre ou cinq chromatogrammes avec des dépôts variant de I à 20 µl afin de trouver des spots correspondant en intensité à ceux de la gamme étalon et dont deux au moins, remplissant ces conditions, permettent de faire une moyenne.

Cette méthode utilisée avec des chromatogrammes à deux dimensions permet tout au plus une approximation à 20% près. Par contre, les limites d'erreur sont moindres si cette technique s'adresse à des chromatographies unidimensionnelles où il est possible de resserer un peu plus la série des doses de la gamme étalon et de se trouver dans des conditions de développement et de révélation absolument identiques.

De toute façon, cette méthode ne peut être considérée que comme une méthode de comparaison et non de dosage.

- Par planimétrie.

Cette méthode ne peut s'appliquer avec une certaine sécurité que sur des chromatogrammes à une dimension et des erreurs inférieures à 5% ne peuvent être faites qu'en mesurant des surfaces de taches dont le Rf est inférieur à 0,50. En fait nous n'avons utilisé cette technique que pour le dosage de la proline suivant la technique proposée par Acher, Fromageot et Jutisz.

La gamme témoin est constituée par le dépôt de 0,2 0,4 ... 1,6 µg de proline; sur la même feuille de papier d'Arches 302 des quantités de 1, 2,5 et 10 µl seront soumises à la migration du solvant dans des conditions parfaitement identiques. Le solvant est le suivant :

n butanol - éthanol absolu (10%) - eau pour saturer . Le Rf de la proline est voisin de 0,20.

La proline est révélée par une solution d'isatine à 0,2% dans le n-butanol acidifié par 4% d'acide acétique. Le chromatogramme est laissé 24 h. à l'obscurité : la proline donne une tache bleue intense, l'oxyproline une tache bleue pâle. Le contour des spots de la proline est mesuré avec un planimètre en s'éclairant d'une lumière jaune. La surface des taches est proportionnelle aux logarithmes des concentrations.

- Par formation de complexes métalliques et élution.

Khouvine, Morteuil et collaborateurs ont proposé pour le dosage de la leucine, lysine, acide aspartique et tyrosine la méthode suivante :
des chromatogrammes à une dimension dans différents solvants sont, après séchage, révélés par la ninhydrine en solution acétonique (0,5%); après passage durant 12 h. à l'étuve à 50°C, les taches découpées en lanière sont placées dans des tubes renfermant une quantité déterminée d'une solution méthanolique de chlorure de cadmium à 0,01%; une coloration rouge immédiate et stable passe rapidement en solution dans l'excès de réactif. De 0,5 ml cette solution est amenée à 5 ml par addition de méthanol; l'élution est complète en très peu de temps (2 à 5 minutes). La lecture est faite au photomètre de Meunier avec le filtre n° 52.

Cette méthode est applicable sur des chromatogrammes bi-dimensionnels. Les solutions étalons sont constituées par l'éluat des complexes formés sur des chromatogrammes témoin. La loi de Beer-Lambert est respectée pour des concentrations allant de 0 à 15 µg en ce qui concerne l'acide aspartique et l'acide glutanique, l'asparagine, la valine et la leucine,
de 0 à 12 µ g pour l'alanine, la thréonine et la lysine
de 0 à 9 µ g pour glycocolle, sérine et acide γ amino-butyrique.

La méthode proposée par Khouvine et collaborateurs n'a pas la prétention d'avoir la précision de celle de Stein et Moore et bien que les erreurs inhérentes à cette technique soient encore de l'ordre de 10%, cette méthode apporte des résultats satisfaisants pour un travail de biochimie comparée. De toute façon, d'ailleurs, de meilleurs résultats sont obtenus toutes les fois qu'il a été possible de séparer les acides à doser par chromatographie unidimensionnelle (par exemple : acide aspartique avec le phénol, valine et leucine avec le butanol).

D - Acides organiques : analyse et dosages.

L'extrait sec d'acides organiques peut être analysé par chromatographie de partage soit sur papier, soit sur gel de silice.

a) Chromatographie sur papier.

Papiers utilisés : Whatman n° 1 ou Arches 302.
Solvants : alcalin : éthanol absolu - ammoniaque 22°B - eau (80-5-15)
acide : n propanol- eucalyptol- acide formique- eau (100-100-40-15) : mélange de Munier, Cheftel et Macheboeuf.

Lors de chromatographies bi-dimensionnelles les solvants sont utilisés dans cet ordre.

La migration des solvants *per descendum* est réalisée en une dizaine d'heures en ce qui concerne le premier solvant et en 12 à 14 heures avec le solvant acide.

Révélation : nous avons utilisé un certain nombre de réactifs indicateurs utilisés en solution alcoolique : vert de bromocrésol, (Nordmann) bleu de bromothymol, aspersion suivie ou non d'une vaporisation d'une solution d'acétate neutre de plomb à saturation dans l'alcool à 90°; la présence de certaines taches n'est pas toujours facile à distinguer avec ces indicateurs.

Un réactif indicateur proposé par Osteux et collaborateurs nous a donné de meilleurs résultats; il s'agit d'une solution aqueuse alcaline d'o.crésol-sulfone phtaléine mélangée extemporanément à une solution tampon de véronal sodique dans l'alcool à 90°; la vaporisation de ce réactif fait apparaître les spots jaunes sur fond rouge.

Mais c'est finalement le mélange iodure-iodate proposé par Van Duuren et modifié par Dupéron que nous avons adopté.

Ce réactif est préparé extemporanément par mélange à parties égales d'une solution d'iodure de potassium à 10% et d'une solution d'iodate de potassium à 5%. Ce réactif, vaporisé sur le chromatogramme fait apparaître les acides par libération d'iode en taches brunes très nettes.

Bien que cette coloration soit labile il est possible de disposer d'un temps suffisamment long pour marquer au crayon le contour des taches apparues.

Lorsque l'on a utilisé le solvant acide il est nécessaire de s'assurer avant la révélation, du départ complet de l'acide formique en vaporisant un peu de réactif sur un coin du chromatogramme; si le papier reste acide, une vaporisation d'eucalyptol suivie d'un nouveau séchage dans un courant d'air chaud facilitera un départ rapide des dernières traces d'acide formique.

La révélation du chromatogramme développé en milieu alcalin ne peut se faire qu'après transformation des sels ammoniacaux en acides libres. Cette libération des acides est réalisée par pulvérisation d'une solution de formol à 4% dans l'alcool éthylique qui éliminera les ions NH_4^+ sous forme d'uroformine. Après séchage les acides seront révélés comme précédemment.

b) Chromatographie sur gel de silice.

Le principe de cette séparation est dû à Isherwood : la phase stationnaire est constituée par une solution d'acide sulfurique 0,5 N supportée par un gel de silice; la phase mobile correspond à un mélange chloroforme-butanol tertiaire à proportion variable. Cette méthode a fait l'objet d'une étude critique due à Bové et Raveux qui en ont donné une technique très détaillée.

Technique :

Le gel de silice est préparé à partir d'acide silicique "Mallinckrodt (400 mesh); à une prise d'essai de 8 g est ajoutée par fraction de I ml une solution de SO^4H^2 0,5 N; chaque addition n'est faite qu'après écrasement, avec un agitateur, des agglomérats formés et homogénéisation parfaite de la poudre qui ne doit jamais adhérer aux parois de l'erlenmeyer. Une quantité de 5 ml de la solution sulfurique est juste nécessaire si la silice est parfaitement anhydre.

La poudre hydratée est mise en suspension dans 60 ml de chloroforme lavé à l'eau distillée et transvasée par fraction de 5,5 ml dans une colonne à chromatographie de 1 cm de diamètre; chaque fraction est sédimentée sous pression d'azote en imprimant au tube un mouvement alternatif de rotation ; le niveau est ainsi net et bien horizontal. Une rondelle de papier filtre exactement calibrée est déposée sur la dernière fraction.

L'échantillon d'acides est déposé de la façon suivante : Réduits à siccité, comme précédemment indiqué, les acides libres sont repris par 0,5 ml d'acide sulfurique N/I; cette solution est intimement mélangée et absorbée par 1 g de silice " Mallincrodt"; mis en suspension dans 10 ml de chloroforme, le gel est transféré sur la colonne dont les parois sont rincées avec ce même solvant. Une rondelle de papier recouvre ce nouveau dépôt. Le ménisque du liquide est amené au ras de la surface. La préparation peut, dès lors, être soumise aux liquides d'élution.

Les liquides d'élution sont constitués par des mélanges, chloroforme-butanol tertiaire en quantité croissante, équilibrés pendant quelques minutes avec I/IO de volume d'acide sulfurique 0,5 N. Les proportions et les volumes d'éluants que nous avons utilisés sont les suivants :

Solvant n° :	1	2	3	4	5	6	7
% de butanol dans le chloroforme :	4	8	13	20	28	35	40 %
Volume utilisé :	120	120	120	100	100	100	120 ml

La vitesse d'écoulement de l'éluant est réglée par pression d'azote de telle sorte que l'on puisse collecter 30 à 40 gouttes à la minute. Le collecteur automatique de fractions est réglé de façon à recevoir environ 3 ml d'éluat par tube.

Le titrage de l'acidité dans chaque tube est fait avec une solution de soude 0,005 N en présence de rouge de phénol. (rouge de phénol ; 0,1 g – NaOH 0,05N : 6 ml - eau décarbonatée : 94 ml.) Dans chaque tube on ajoute 3 ml d'eau décarbonatée, une goutte du réactif indicateur. Le titrage est réalisé avec une microburette au I/50 en agitant vigoureusement en fin de titrage pour faire passer complètement l'acide libre de la phase chloroformique dans la phase aqueuse.

Le résultat de tous les dosages est exprimé sous forme de graphique, le numéro des tubes étant porté en abcisse, les quantités de Na OH en ordonnées.

Cette technique permet de doser et de détecter les acides organiques mais non de les déterminer avec exactitude bien que leur ordre d'élution soit toujours le même et que cet ordre de passage soit en rapport assez direct avec le Rf de ces mêmes acides chromatographiés sur papier en milieu acide. Les acides les premiers élués ont un Rf élevé, les derniers un Rf faible.

Il est donc nécessaire de faire une détermination précise des acides organiques après les avoir dosés (leur quantité est exprimée en micro-équivalents.)

Les caractéristiques peuvent être faites par l'emploi de réactions analytiques ou en utilisant la chromatographie de partage sur papier en présence de témoins, soit des acides eux-mêmes, soit des composés de réaction donnés par ces acides, les dinitro-phényl - hydrazones des acides cétoniques par exemple.

c) Réactions analytiques particulières :

Les dosages sont faits en présence de rouge de phénol, réactif indicateur hydrosoluble donc difficilement éliminable; les réactions colorées spécifiques de certains acides ne peuvent, de ce fait, être utilisées, à moins de séparer l'acide du rouge de phénol par chromatographie. Cependant, Jolchine indique pour l'acide malique une réaction de fluorescence donnée par l'acide malique en présence de β-naphtol, réaction sans interférence avec le réactif indicateur. D'autre part nous avons pû mettre en évidence l'acide acétique en utilisant la condensation de Piria qui permet de transformer cet acide en acétone.

- Acide malique : une partie de la fraction supposée renfermant l'acide est évaporée à sec; le résidu est traité par 1 ml d'une solution sulfurique de β naphtol (2,5 mg dans 100 ml de SO^4H^2 commercial); après chauffage au bain-marie, l'acide malique donne une fluorescence bleue intense, caractéristique.

- Acide acétique : la solution aqueuse d'acétate présumé est additionnée de 1 g environ de carbonate de calcium; une distillation sous vide à température de 50°C permet de chasser à peu près toute l'eau; le tube Pyrex contenant le mélange carbonate-acétate est bouché avec un bouchon traversé d'un capillaire recourbé dont l'extrémité trempera dans une solution de nitroprussiate de sodium à 1%, acidifiée par l'acide acétique. La partie du tube renfermant l'acétate de calcium est chauffée au bec Bunsen; la distillation sèche entraîne l'acétone formé dans le réactif de Legal; (1 à 2 ml). Le dépôt de 0,5 ml d'ammoniaque à la surface du réactif donnera un anneau rouge violacé au niveau de contact des deux liquides dans le cas d'une réaction positive.

Devant la faible quantité d'acide acétique séparé généralement il est bon d'attendre 2 à 3 minutes avant de voir apparaître avec netteté un anneau rose mauve.

Cette réaction permet de détecter 40 µg/ml d'acétone; elle est encore plus sensible en présence d'acide acétyl-acétique mais ne pourrait être faite, pour la détection de cet acide, que sur une fraction non dosée.

- Identification par chromatographie.

1/ des acides libres : les fractions représentées par des pics sur les graphiques de dosages sont réunies et évaporées sous vide au bain-marie à une température de l'ordre de 40°C; les acides sont sous forme de sels de sodium ce qui leur assure une relative stabilité. Le résidu sec est repris par un minimum d'alcool à 50%; cette solution sera chromatographiée en présence d'acides organiques témoin, en utilisant uniquement le solvant acide; l'acide formique de ce solvant libère très facilement les acides de leurs sels.

2/ des 2-4 dinitro-phényl-hydrazones. Les acides cétoniques présentent une trop grande fragilité pour être analysés comme les autres acides organiques. Il est préférable de caractériser leurs hydrazones. La technique utilisée est celle proposée par Jolchine et utilisée par Cronenberger.

Les fractions renfermant en principe les céto-acides sont traitées par une solution à 0,2% de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans HCl 20% ; les hydrazones sont séparées de l'hydrazine par passages successifs dans l'acétate d'éthyle en milieu acide puis en milieu aqueux alcalinisé par le carbonate de sodium; après acidification chlorhydrique et reprise des hydrazones par l'acétate d'éthyle, celles-ci seront reprises par une petite quantité d'éthanol après évaporation de l'acétate d'éthyle. La solution éthylique est déposée sur papier d'Arches 302 et soumise au développement par le solvant suivant :

alcool amylique tertiaire- éthanol - eau (50 - 10 - 40) . Les spots des hydrazones sont révélés par pulvérisation d'une solution de soude à 5%.

II - METABOLISME AZOTE AU COURS DE LA GERMINATION DE LA CROISSANCE DE JEUNES PLANTULES OU DE DEVELOPPEMENT DE CULTURES DE TISSUS "*in vitro*". EXPRESSIONS DES RESULTATS ANALYTIQUES ET QUANTITATIFS.

R A D I S

- Conditions expérimentales

Les graines de Radis sont immergées pendant 15 h. (une nuit), dans de l'eau ordinaire d'une part, ce qui constituera les lots témoin, et dans une solution de chlorhydrate de Tétracycline à concentration de 100 μg/ml d'autre part.

Après lavage, les graines sont placées dans des cristallisoirs sur coton-papier filtre imbibé d'eau ordinaire, à température constante de 22° et sous éclairement artificiel et régulier de deux fois 6 heures sur 24. Le temps 0 de l'expérience est noté à partir du moment de l'immersion des graines.

Les prélèvements de matériel végétal sont faits à la 22ème heure et à la 90ème. Sur ces échantillons seront dosés les acides aminés et les acides organiques.

- Résultats :

1/ Quantité d'azote en g pour 100 g de poids sec

	Graine	Témoin		Traité Tétracycline 100 μg/ml	
		22 h.	90 h.	22 h.	90 h.
N total	3, 880	3, 790	3, 820	3, 960	3, 726
N protéique	3, 493	3, 115	2, 879	3, 142	2, 442
N soluble	0, 387	0, 675	0, 941	0, 818	1, 284
N amidé (asparagine et glutamine)	0, 005	0, 005	0, 042	0, 014	0, 045
N aminé	0, 055	0, 096	0, 260	0, 288	0, 364
N sol. / N prot.	0, 11	0, 21	0, 31	0, 26	0, 53

L'azote total est dosé par kjeldahlisation ainsi que l'azote soluble. Les composés azotés solubles sont extraits au bain-marie par de l'alcool éthylique d'abord à 90° qui précipite les protéines puis par l'alcool à 50° et par l'eau. L'extrait hydro-alcoolique est enfin additionné d'une solution d'acide trichloracétique de telle sorte que la concentration de cet acide soit de 10%. Ce dernier extrait est centrifugé au bout de 12 h. 3 minéralisations seront faites sur des parties aliquotes du surnageant.

L'azote aminé et l'azote amidé sont calculés sur le résultat des dosages des acides aminés.

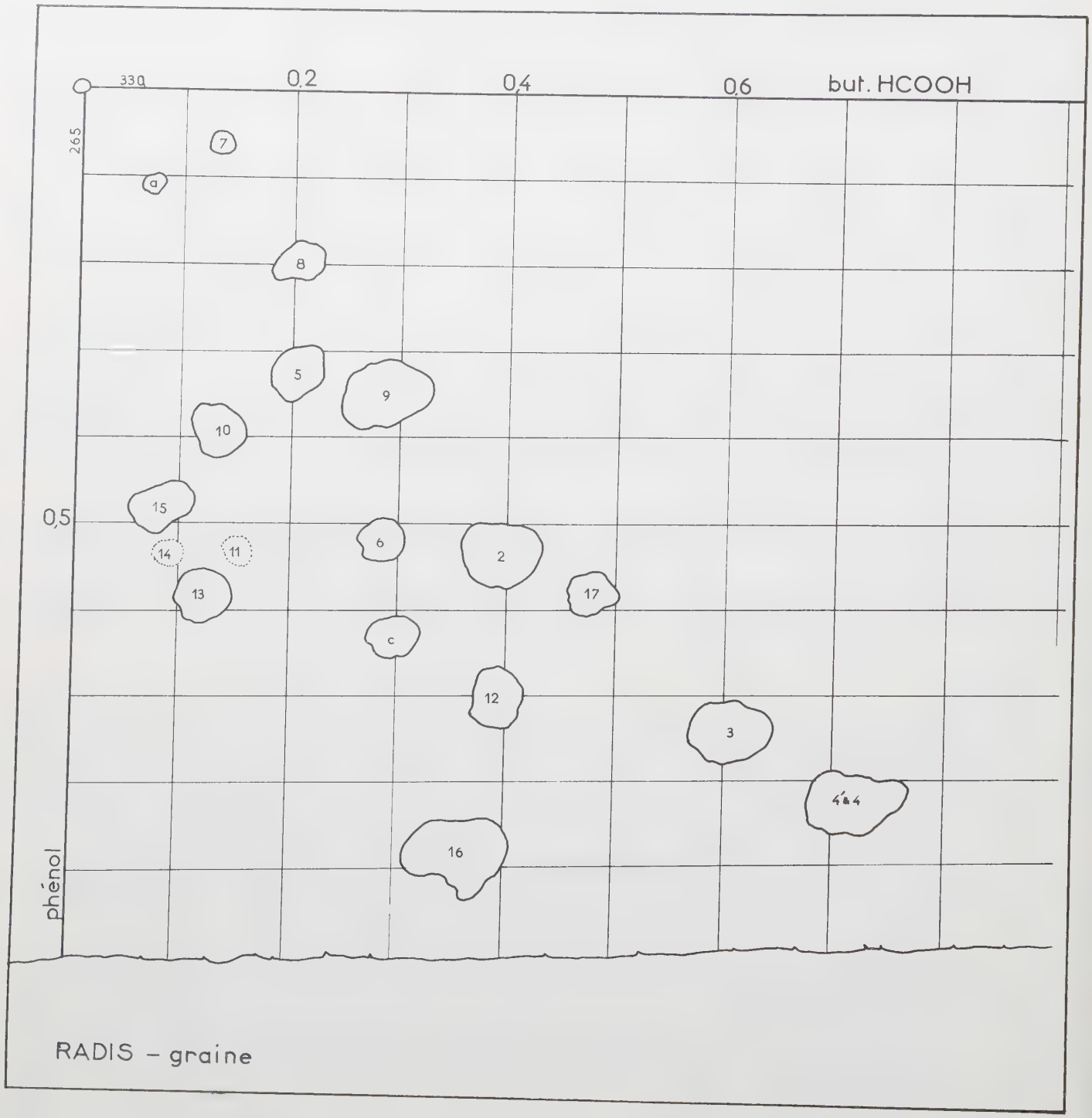
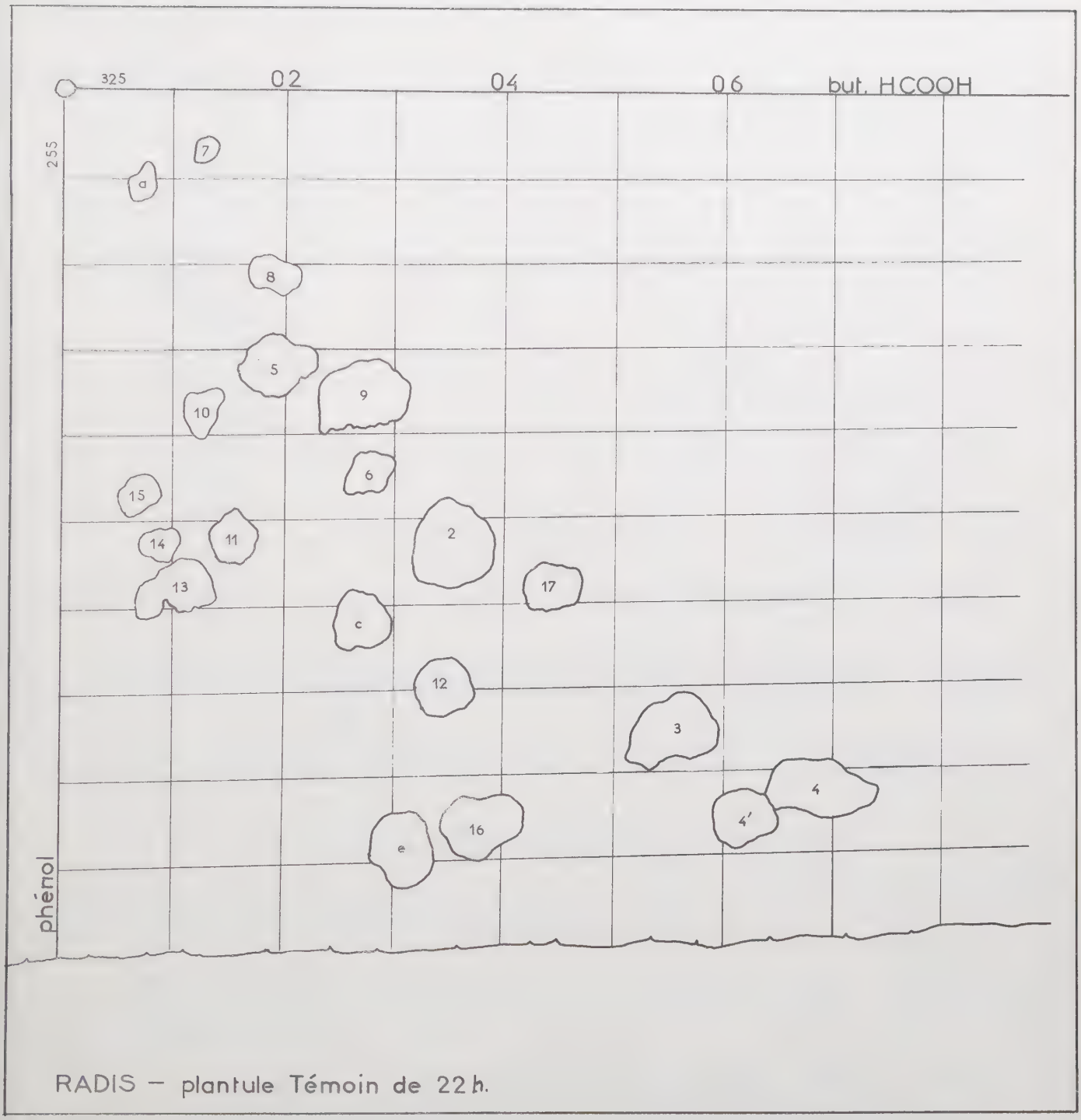
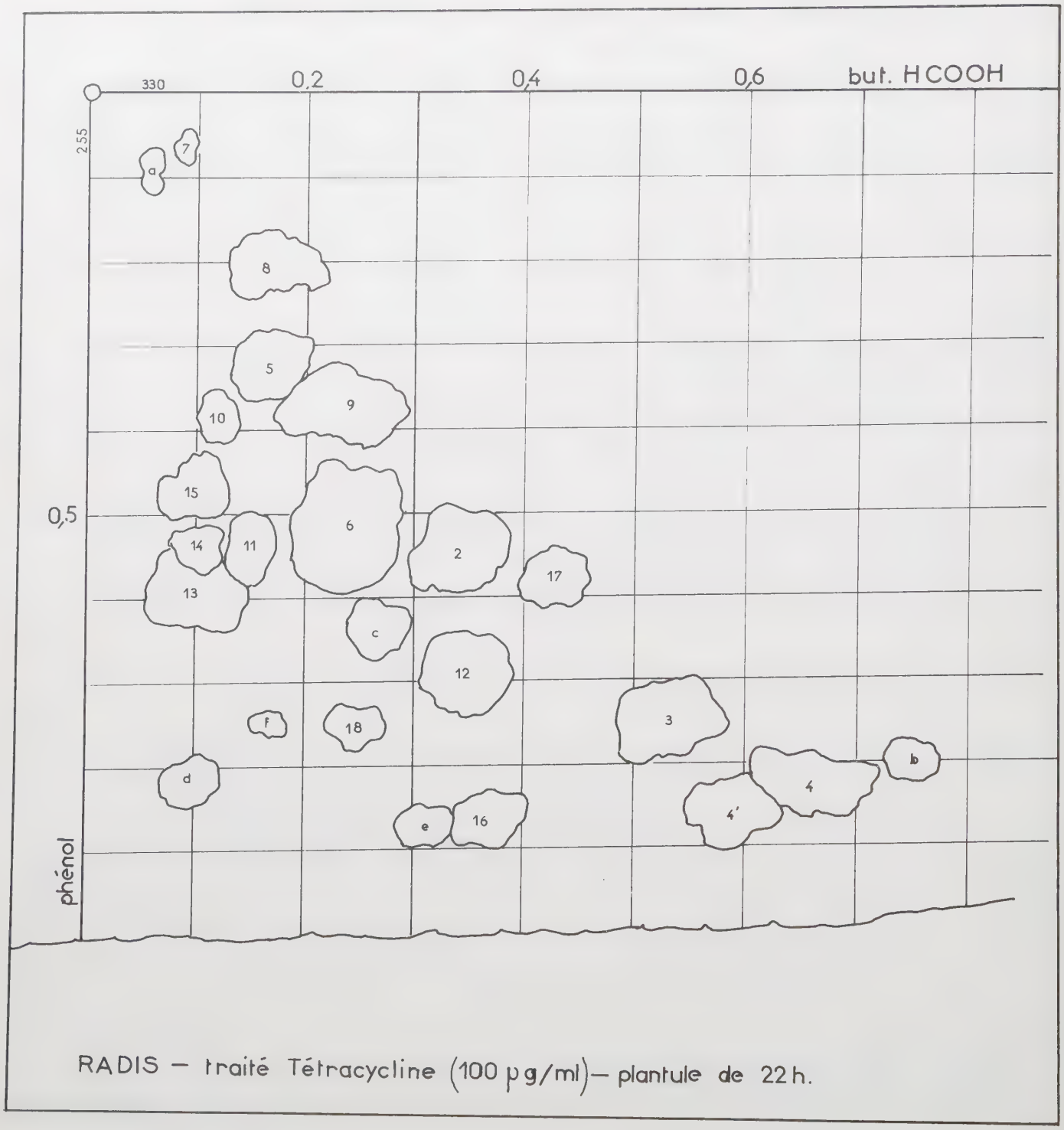


Fig. 5 - Chromatogramme des amino-acides de la graine de Radis.



RADIS – plantule Témoin de 22 h.

Fig.6 -



RADIS – traité Tétracycline (100 µg/ml) – plantule de 22 h.

Fig. 7 -

ACIDES AMINES - Résultats exprimés en mg pour 100 g de poids sec de graine ou de plantule de Radis. (les n° des acides correspondent à ceux des spots des chromatogrammes - fig. 5, 6 et 7).

	Graine	Témoin		Traité Tétracycline 100 µg/ml	
		22 h.	90 h.	22 h.	90 h.
1 - Glycocolle	0	0	30	12	20
2 - Alanine	41	102	192, 5	192	598
3 - Valine	17	21	166	105	219
4 - Leucine + Isoleucine	33	27, 5	185	103	246
5 - Sérine	11, 5	49	96	103	121
6 - Thréonine	8, 5	10	92, 5	130	116
7 - Cystine	traces	12	26	45	23
8 - Ac. Aspartique	52, 5	126	75	666	120
9 - Ac. Glutamique	78	161	231	285	266
10 - Asparagine	60, 5	37, 5	146	66	149, 5
11 - Glutamine	traces	17, 5	339	92	364
12 - Ac. γ amino-butyrique	25, 5	17, 5	65	107	55
13 - Arginine	63	82, 5	109	203	69
14 - Histidine	8	16	256	84	290
15 - Lysine	22	11	58, 5	135	55
16 - Proline	60	125	197	188	252
17 - Tyrosine	47	64	191	137	249

Cependant les chromatogrammes révèlent la présence d'autres amino-acides ou peptides. Certains ont été identifiés mais non dosés, tels l'hydroxyproline (8), la phénylalanine (b) et le glutathion (a) ; les spots c, d, e et f n'ont pas été identifiés.

Tache a : identifiée comme étant du Glutathion. L'intensité relative de la coloration à la ninhydrine fait apparaître que les quantités de ce peptide sont moins importantes dans les plantules traitées, à la 22ème et à la 90ème heure.

Tache b : (non déterminée) n'est apparente que chez les plantules traitées.

Tache 18 : coloration jaune orangé par la ninhydrine, et bleu pâle par l'isatine, ce qui caractérise avec les valeurs respectives des Rf l'Hydroxyproline. Cet amino-acide n'apparaît nettement que dans la plantule traitée à sa 22ème heure de croissance.

Tache c : non identifiée; coloration rouge violacé à la ninhydrine. En éluant cette fraction par du méthanol renfermant du chlorure de cadmium suivant la technique de Mortreuil, et en comparant les colorations roses obtenues au photomètre de Meunier, les quantités comparatives peuvent être exprimées comme suit :

Graine : 1	Témoin de 22 h. : I Témoin de 90 h. : 24	Traité de 22 h. : 10, 5 Traité de 90 h. : 10

en résumé ce composé s'accumule dans le témoin et semble rester en quantité constante dans la plantule traitée.

Tache d : non identifiée; coloration rouge violacé par la ninhydrine.

Tache e : cette tache située près de celle de la proline s'en différencie très nettement, bien que la réaction à la ninhydrine provoque une coloration assez voisine; la proline est colorée en jaune vif; le spot voisin présente une coloration gris orangé; de plus, les deux taches sont très nettement séparée sur le chromatogramme " Témoin 22 h."

Tache f : n'apparaît que chez la plantule traitée de 22 h. Coloration rose-violacé à la ninhydrine.

Il semble que les taches d, e et f correspondent à des peptides; nous n'avons pas pu en déterminer la nature.

Aux résultats précédents il convient d'ajouter ceux d'une expérience réalisée dans des conditions à peu près identiques et ne s'en différenciant que par la nature de l'antibiotique, Oxytétracycline au lieu de Tétracycline, et par la date des prélèvements (7ème et 9ème jour); nous avons vu que ces antibiotiques ont une activité très voisine, de telle sorte que cette expérience nous permettra de suivre un peu plus longtemps l'évolution de certains amino-acides.

	Témoin		Traité Tétracycline 100 µg/ml	
	7ème j.	9ème j.	7ème j.	9ème j.
Alanine	142	108	300	265
Valine	260	130	240	120
Leucine + Iso	204	ind.	206	ind.
Sérine	136	131	138	265
Ac. aspartique	68	43	86	80
Ac. glutamique	204	195	258	320
Asparagine	70	65	50	50
Glutamine	320	345	242	260
Proline	100	ind.	120	ind.

POIS

- Conditions expérimentales

Les lots sont préparés de la même façon que ceux du Radis. La solution d'antibiotique utilisée dans cette expérience est de 30 µg/ml de chlorhydrate de Tétracycline.

Des dosages d'azote total et azote soluble ont été faits séparément sur les cotylédons d'une part, sur le reste de la plantule d'autre part, au 4ème, 8ème et 11ème jours.

Les acides aminés et les acides organiques ont été dosés sur des prélèvements faits le 7ème jour.

1/ Quantité d'azote en g pour 100 g de poids sec.

		4ème j.		8ème j.		11ème j.	
	Graine	T	S	T	S	T	S
				- Cotylédons -			
N total	4, 840	4, 208	4, 623	3, 561	4, 275	2, 394	3, 151
N protéique	4, 271	3, 097	3, 582	2, 407	3, 115	0, 829	1, 601
N soluble	0, 569	1, 111	1, 041	1, 154	1, 160	1, 565	1, 550
N sol. / N prot.	0, 13	0, 36	0, 29	0, 48	0, 37	1, 89	0, 97
				- Plantules -			
N total	-	10, 808	7, 787	9, 779	8, 984	6, 055	5, 893
N protéique	-	-	-	5, 224	4, 557	3, 213	3, 150
N soluble	-	-	-	4, 555	4, 427	2, 842	2, 743
N sol. / N prot.	-	-	-	0, 87	0, 97	0, 88	0, 87

2/ Acides aminés - Plantule totale : cotylédons + tige et racines
Résultats en mg pour 100 g de poids sec.
Prélèvement du matériel au 7ème jour.

	Graine	Témoin	Tétracycline 30 µg/ml
Alanine	23	177	198
Valine	32	220	162
Leucine et iso	18	133	106
Sérine	18	176	202
Thréonine	115	620	496
Cystéine	ind.	ind.	ind.
Ac. aspartique	80	221	156
Ac. glutamique	207	1060	848
Asparagine	18	159	254
Glutamine	9	18	28
Arginine	1194	1945	1834
Histidine	41	274	297
Proline	21	88	134
N aminé	159	501	462
N aminé (asparagine et glutamine)	2, 5	16, 7	26, 4

Azote aminé et azote amidé ont été calculés sur les résultats de dosage des amino-acides.

La liste précédente ne correspond pas à tous les acides aminés que l'on peut trouver dans la graine ou dans les plantules de Pois ; d'autres acides aminés ont été détectés, déterminés mais non dosés.

Parmi les amino-acides déterminés :

Acide γ amino-butyrique : cet acide semble constituer une réserve assez importante dans la graine; il se trouve en quantité beaucoup plus faible dans les plantules au 7ème jour; cependant la comparaison des taches montre une identité de concentration entre les lots traités et les témoins.

Phénylalanine : présente dans la graine, ne se retrouve qu'à l'état de traces dans les plantules en croissance.

Lysine : on peut faire pour cet acide les mêmes remarques que pour l'acide γ amino-butyrique.

Hydroxyproline : présente en petite quantité dans l'extrait " graine"; non trouvée sur les autres chromatogrammes.

Enfin, deux spots de Rf très faible dans le butanol (0,01/0,02) et de Rf dans le phénol respectivement de 0,35 et 0,58, paraissent correspondre à des peptides; une hydrolyse de l'extrait de graine à 135° pendant 10 h. à l'autoclave dans une solution d'acide chlorhydrique 8 N, entraîne la disparition de ces deux composés. Nous n'avons pas déterminé la nature de ces peptides; quoi qu'il en soit, ceux-ci n'existent pas dans les plantules traitées ou non au 7ème jour.

TOPINAMBOUR

- Conditions expérimentales

Des fragments absolument identiques sont prélevés à l'emporte-pièce dans la région cambiale du tubercule et cultivés suivant la méthode de Gautheret en tubes sur milieux nutritifs gélosés, milieux auxquels ont été ajoutés des quantités variables de chlorhydrate de Tétracycline, de Chlorotétracycline et d'Oxytétracycline; la concentration en antibiotique dans le milieu, varie de 5 à 30 µg/ml. Les quantités de 5 et 10 µg/ml ne provoquent pas de différences sensibles dans la croissance des cals traités par rapport aux cals témoins; par contre une concentration de 30 µg permet de bonnes observations.

D'autre part, après avoir déterminé l'action des trois antibiotiques sur le bilan des amino-acides au 40ème jour de croissance, nous avons suivi les variations dans le temps de certains de ces acides, en utilisant un seul antibiotique, le chlorhydrate de Tétracycline à la dose de 30 µg/ml; les prélèvements ont été faits les 11ème, 20ème, 31ème et 45ème jours.

- Résultats

CULTURE DE TISSUS DE TUBERCULE DE TOPINAMBOUR

1/ Acides aminés. Résultats en mg/100g de poids sec de tissus

	Tubercule	Témoin	Oxy-Tétrac.	Chloro-Tétrac.	Tétracycline
Alanine	20	21	18	15	24
Valine	85	22	70	100	94
Leucine + Isoleucine	70	28	28	30	38
Sérine	28	14	5	4	9
Thréonine	72	11	4	5	5
Ac. Aspartique	50	196	149	120	143
Ac. Glutamique	227	133	42	75	66
Asparagine	85	84	19	23	24
Glutamine	92	42	51	50	75
Arginine	570	151	79	55	25
Proline	traces	20	28	50	33

D'autres acides ont été déterminés mais non dosés :
- dans le tubercule : glycocolle, phénylalanine, tyrosine
- dans les cals : ces mêmes acides plus acide γ amino-butyrique et hydroxyproline.

2/ Azote. Quantité en g pour 100 g de poids sec.

	Tubercule	Témoin	Oxytétrac.	Chlorotétrac.	Tétracycline
N total	1, 024	1, 062	0, 984	0, 877	0, 852
N protéique	0, 667	0, 729	0, 696	0, 607	0, 591
N soluble	0, 357	0, 333	0, 288	0, 270	0, 261
N amine	0, 113	0, 072	0, 051	0, 055	0, 057
N amidé (asp. + glu)	0, 016	0, 012	0, 0062	0, 0065	0, 0088
N sol/ N prot.	0, 53	0, 45	0, 41	0, 44	0, 44

3/ Teneur en azote des tissus en fonction de leur croissance.

Quantités d'azote exprimées en g pour 100 g de poids sec de tissus.
(milieu de culture renfermant 30 µg/ml de chlorhydrate de Tétracycline)

	0	11ème		20ème		31ème		45ème jour	
	Tubercule	T	S	T	S	T	S	T	S
N total	1, 024	0, 984	1, 231	0, 974	0, 962	1, 062	0, 852	1, 202	0, 865
N protéique	0, 667	0, 622	0, 668	0, 577	0, 592	0, 729	0, 591	0, 904	0, 561
N soluble	0, 357	0, 362	0, 563	0, 397	0, 370	0, 333	0, 261	0, 298	0, 304
N sol/Npr.	0, 53	0, 58	0, 84	0, 68	0, 62	0, 45	0, 44	0, 33	0, 54
- S = Sanclomycine = Tétracycline									

Les cals poussent sur un milieu nutritif duquel ils tirent les éléments propres à leur synthèse, notamment protidique; il apparaît intéressant d'indiquer les quantités d'azote, non pas en pourcentage par rapport au poids de matières sèches, mais en valeurs absolues, le tableau suivant donnant les quantités d'azote renfermées dans un cal et exprimées en mg.

	0	11ème		20ème		31ème		45ème	
	Tubercule	T	S	T	S	T	S	T	S
N total	0, 430	0, 502	0, 476	0, 753	0, 524	1, 448	0, 595	1, 639	0, 844
N protéique	0, 281	0, 317	0, 258	0, 446	0, 322	0, 994	0, 413	1, 233	0, 547
N soluble	0, 149	0, 185	0, 218	0, 307	0, 202	0, 454	0, 182	0, 406	0, 297

Les quantités d'azote protéique évoluent suivant une courbe de même allure que celle de la croissance.

4/ Evolution des concentrations de quelques acides dans le temps.

Résultats en mg/100 g de poids sec
Les prélèvements ont été faits les 11ème, 20ème, 31ème et 40ème jours.

	0	11ème		20ème		31ème		40ème jour	
	Tubercule	T	S	T	S	T	$\bar{S}$	$\bar{T}$	$\bar{S}$
Alanine	20	nd.	46	33	57	135	120	28	32
Valine	85	96	142	82	200	14	153	20	86
Sérine	28	26	23	16	11	10	8	8	8
Ac. glutamique	227	226	200	205	143	54	48	105	46
Arginine	570	64	108	49	57	101	43	208	23
Proline	traces	322	340	107	285	40	96	14	28

III - ACTION DU CHLORHYDRATE DE TETRACYCLINE SUR LE METABOLISME DES ACIDES ORGANIQUES DU POIS ET DU RADIS DANS LES PREMIERS STADES DE LEUR CROISSANCE . EXPRESSION DES RESULTATS ANALYTIQUES ET QUANTITATIFS.

L'analyse et le dosage des acides organiques ont été réalisés sur les mêmes prises d'essais que celles qui ont servi à l'étude du métabolisme des amino-acides; les techniques mises en oeuvre ont été décrites précédemment.

RADIS

Les dosages ont été effectués sur des lots de graines ou de plantules issues de 10 g de graines exactement pesées; les réserves cotylédonaires pouvaient ainsi être considérées comme identiques ; les lots entiers ont été prélevés au temps 0, 22h. et 90 h. Les résultats exprimés sous forme de graphique (fig. 8 et 9) sont ainsi exactement comparables, et offrent une appréciation visuelle de l'action de l'antibiotique (chlorhydrate de Tétracycline à 100 µg/ml) sur le métabolisme des acides organiques.

- Résultats : Acides organiques; quantités exprimées en µéq/100 g de poids sec.

	n° des graph.	Graine	Témoin		Traité Tétracycline 100 µg/ml	
			22 h.	90 h.	22 h.	90 h.
Ac. Acétique	1	24	28	55	35	38
Ac. Acétyl-acétique	2	0	0	54	8	4
Ac. Pyruvique	3	16	14	21	38	31
Ac. Fumarique	4	42	13	114	27	15
Ac. α Cétoglutarique	5	69	175	24	161	12
Ac. Succinique	6	225	91	528	215	102
Ac. Aconitique	7	70	69	318	151	105
Ac. Pyrrolidone-carboxylique	8	31	12	226	26	39
Lactone Isocitrique	9	52	22	356	20	57
Ac. Glycolique	10	471	2870	2648	3885	770
Ac. Malique	13	1386	559	2530	1907	950
Ac. Citrique	14	477	196	1593	540	530
Ac. Isocitrique	15	440	74	312	80	289
Ac. Tartrique	16	833	80	0	52	0
Acides non identifiés :						
-	11	48	22	34	84	52
-	12	191	102	172	176	159
-	x1	0	0	0	6, 2	1, 3
Acidité totale		4375	4327	8985	7511	3154

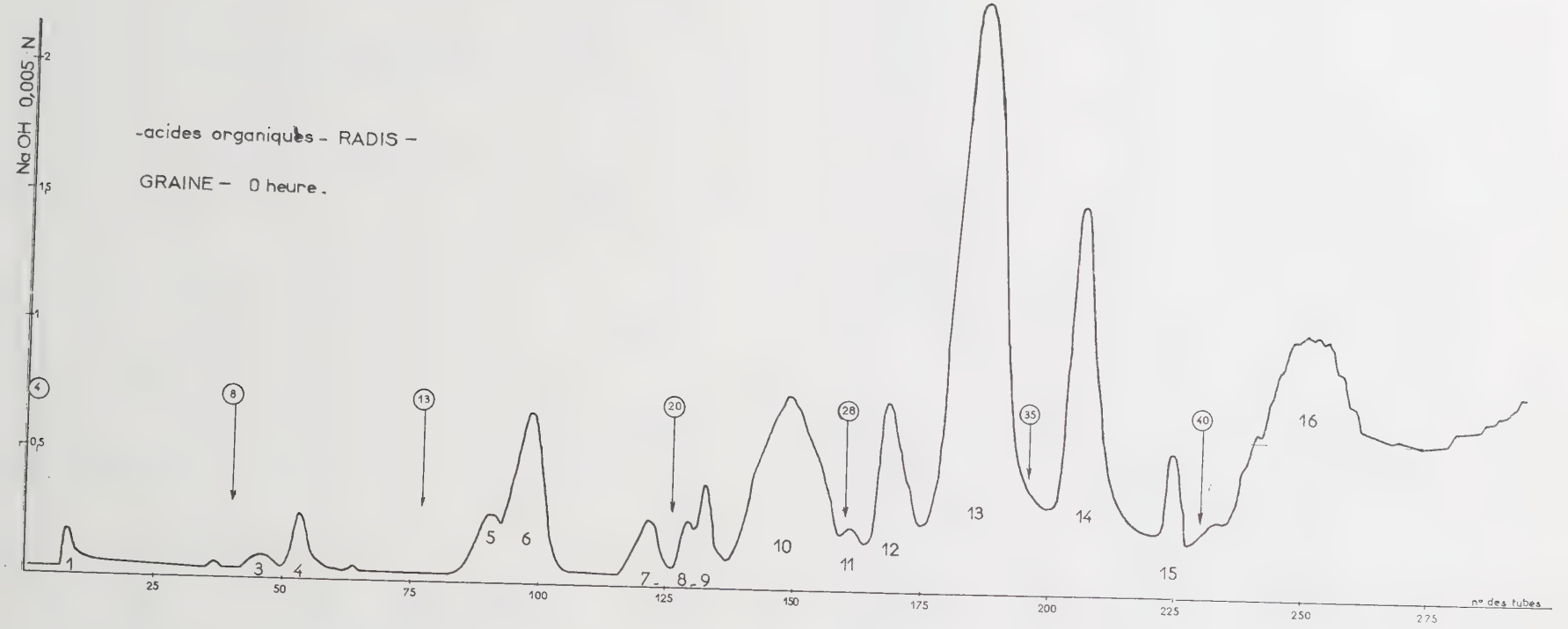

NaOH 0,005 N
2
1,5
1
0,5
-acides organiques - RADIS -
GRAINE - 0 heure.
4
8
13
20
28
35
40
1
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
25
50
75
100
125
150
175
200
225
250
275
n° des tubes

Fig. 8 -

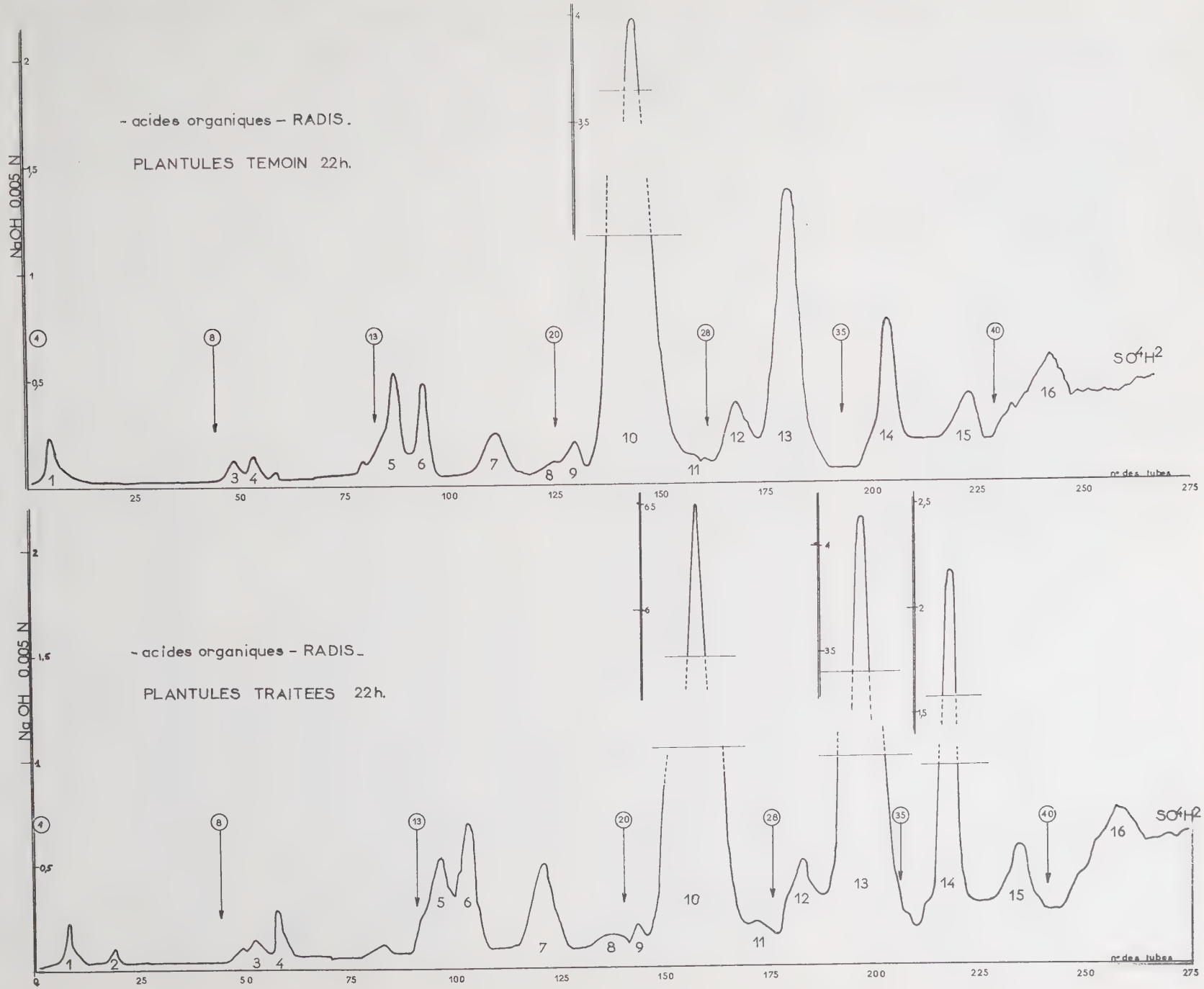

- acides organiques - RADIS.
PLANTULES TEMOIN 22h.
NaOH 0,005 N
SO4H2
n° des tubes
- acides organiques - RADIS.
PLANTULES TRAITEES 22h.
NaOH 0,005 N
SO4H2
n° des tubes

Fig. 9 -

- Analyse et caractérisation des acides

- Acidité totale

Les acides ont été extraits et séparés suivant la méthode précédemment indiquée; au cours de ces opérations et afin de contrôler l'absence de pertes éventuelles, un dosage de l'acidité totale est fait, en présence de rouge de phénol, sur l'effluent de la résine cationique, autrement dit après désalification. Malgré tous les soins pris pour éviter les pertes, l'acidité totale calculée par addition de celle de chacun des acides est inférieure à l'acidité déterminée sur l'effluent cationique. L'acidité totale retrouvée a été de 87,3% pour la graine, 91,4 et 94% pour T_{22} et T_{90} ; 92,1 et 88,7% pour respectivement S_{22} et S_{90} . Les conditions opératoires ont été les mêmes pour le traitement de chacun des lots, de telle sorte que l'on peut admettre que les écarts se feront, pour chacun d'eux, dans le même sens.

De toute façon, ces pertes étant comprises entre 6 et 13%, nous ne tiendrons compte, dans les interprétations de ces résultats, que des variations supérieures à ces pourcentages.

- Caractérisation des acides

1/ Ac. Acétique : la séparation chromatographique ne donne aucun résultat; pas de spot: acide volatil. La condensation de Piria, en présence de carbonate de Calcium permet de déceler une formation d'acétone mise en évidence par le réactif de Legal.

2/ Ac. Acétyl-acétique : caractérisé par la chromatographie de sa dinitro-phénylhydrazone. Ne possèdant pas d'échantillon témoin, nous nous sommes adressés aux valeurs de Rf données par Ranson; la dinitro-phénylhydrazone de l'acide à caractériser a été chromatographiée en présence des hydrazones de l'acide pyruvique et de l'acide α cétoglutarique; le développement est réalisé sur papier Whatman I avec le solvant pentanol tertiaire - éthanol-eau. Les valeurs de Rf trouvées sont les suivantes, en comparaison avec celles indiquées dans la littérature (ces dernières indiquées entre parenthèses).

Acide pyruvique :	0,35	(0,36)
Ac. α cétoglutarique :	0,14	(0,16)
X - Ac. acétyl-acétique présumé :	0,48	(0,50)

En réalité, l'acide pyruvique présente un deuxième spot, moins important que le premier, de Rf 0,45; la présence de deux spots correspondant pour cet acide est signalée par la plupart des auteurs.

Quoi qu'il en soit, la valeur de ce Rf semble bien définir la présence d'acide acétylacétique dans les plantules de Radis, ce qui ne saurait surprendre vu les réserves lipidiques de cette espèce.

Au cours de la préparation des hydrazones, le rouge de phénol n'est pas éliminé; sa présence ne gêne en rien la caractérisation des spots; il est très bien séparé par ce solvant et se situe à une valeur de Rf de 0,22.

3/ Ac. Pyruvique : caractérisé par sa dinitro-phényl hydrazone en présence d'un témoin, comme indiqué précédemment.

4/ Ac. Fumarique : Rf identique à celui du témoin (0,82 - 0,84) en chromatographie sur papier Arches 302 avec le solvant Propanol-Eucalyptol-Ac.formique-eau.

5/ Ac.α Céto-glutarique : caractérisé par son hydrazone (0,14)

6/ Ac. Succinique : cet acide est très mal séparé de l'acide α cétoglutarique; la détermination de ces deux acides a été faite en prenant les premières et les dernières fractions de cet éluat; la chromatographie des acides indique pour les dernières fractions un acide de Rf 0,62 - 0,64, même Rf que l'acide succinique témoin et un acide de Rf 0,57 pour les premières fractions, acide α céto-glutarique confirmé par la caractérisation de son hydrazone.

Le dosage est fait globalement pour ces deux acides; la présence cependant de deux pics permet de décomposer les deux courbes puis par planimétrie d'établir les proportions et d'attribuer à chacun leur propre valeur.

Le rouge de phénol a, dans ces conditions de développement chromatographique, un Rf de 0,68; sa tache chevauche celle de l'acide succinique; mais la révélation par le mélange iodure-iodate permet une distinction très nette.

7/ Ac. Aconitique : caractérisé par son Rf identique à celui du témoin (0,60)

8, 9 et 10 : l'élution du gel de silice par le mélange à 20% de butanol tertiaire fait apparaître trois pics, l'un très important (n°10), les deux autres insuffisamment séparés l'un de l'autre, le précédant; l'analyse chromatographique sur papier montre des taches de Rf 0,42, 0,38 et 0,38. Ces valeurs de Rf éliminent l'acide oxalique qui a un Rf de 0,04/0,05.

L'étude critique de cette méthode de séparation sur gel de silice, faite par Bové et Raveux, montre que les acides élués dans cette fraction et par ordre d'élution, sont les suivants :

Ac. Pyrrolidone-carboxylique, Lactone Isocitrique, Ac. Oxalique, et Ac. Glycolique + Ac. Tricarballylique passant ensemble.

L'analyse de chaque fraction montre l'absence d'acide oxalique.

La révélation des acides sur papier par le nitrate d'argent ammoniacal est très positive pour l'acide n° 10 (tache brun noir, après chauffage I/4 d'heure à 105°); cet acide est donc un acide hydroxylé, en l'occurence l'acide Glycolique, cependant cette caractérisation ne permet en rien de conclure à l'absence, dans cette fraction, d'acide Tricarballylique.

Quant aux pics 8 et 9, leur présence au cours de tous les fractionnements permet de penser qu'ils correspondent bien à deux acides et se référant au travail de Bové il ne pourrait s'agir que respectivement de l'acide Pyrrolidone carboxylique et de la lactone Isocitrique.

13/ Acide Malique : Rf : 0,35 identique à celui de l'acide témoin.
Résidu sec + 1ml de solution sulfurique de β naphtol : fluorescence bleue intense après chauffage au bain-marie.

14/ Acide Citrique : sa caractérisation par chromatographie montre son identité par rapport à une solution témoin. Rf : 0,25 - 0,27.

15/ Acide Isocitrique : Cet acide présente une tache de Rf 0,24 chromatographié sans préparation, par contre, en traitant le chromatogramme, avant développement, suivant la technique décrite par Cheftel, Munier et Macheboeuf, c'est à dire, en traitant le dépôt par une goutte d'acide sulfurique 0,5 N, chauffage à 100° pendant une heure puis développement, on obtient un spot de Rf 0,38/0,39 c'est à dire identique à celui de la fraction 9 identifiée comme renfermant la lactone Isocitrique. Ce procédé permet ainsi de confirmer les deux caractérisations, lactone isocitrique et acide isocitrique.

16/ Acide Tartrique : L'élution par le mélange Chloroforme-Butanol tertiaire 40% entraine une acidité de base, sulfurique, assez importante. Après que l'acide tartrique ait été élué la courbe d'acidité commence à croître d'une façon assez irrégulière.

Prenons par exemple l'extraction " RADIS- Graine" : une chromatographie de la fraction correspondant au tube n° 250 fait apparaître deux spots l'un de Rf 0,14 - 0,15 correspondant à l'acide tartrique, l'autre presque aussi important situé au point de départ et étant celui de l'acide sulfurique; une autre chromatographie des fractions contenues dans les tubes de 260 à 265 laisse encore percevoir une faible quantité d'acide tartrique avec beaucoup d'acide sulfurique. Ainsi il apparaît difficile de déterminer avec une certaine exactitude les quantités d'acide tartrique. Nous avons considéré comme valeur " à blanc" toute l'acidité se trouvant sous un trait théorique passant par une valeur moyenne de l'acidité minérale dosée après élution de l'acide tartrique.

P O I S

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles qui concernent les amino-acides; à la différence de celles-ci cependant, les acides organiques ont été extraits des tiges et racines; les cotylédons avaient été enlevés.

- Résultats : Acides organiques (graphique fig. 10)
Prélèvement fait au 7ème jour sur des plantules témoins et traitées (tiges et racines; les cotylédons ont été enlevés).
Quantités exprimées en γ équ./100 g de poids sec.

n°	Acide	Témoin	Tétracycline 30μg/ml	Ac. Tétrac. / Ac. Témoin
1	Indéterminé	186	252	-
x_1	-id-	13, 9	0	-
2	Ac. Pyruvique	24, 8	29, 2	1, 18
3	Ac. Fumarique	136	35	0, 26
x_2	Indéterminé	20, 2	0	-
4	Ac. α Cétoglutarique	20	8	0, 40
5	Ac. Succinique	21	36, 5	1, 74
6	Ac. Aconitique	36	30	0, 83
7	Ac. Pyrrolidone-carboxylique + Lactone Isocitrique	200	102	0, 51
8	Ac. Glycolique	139	44	0, 32
x_4	Indéterminé	9, 6	0	-
9	Ac. Malique	660	217	0, 33
10	Ac. Citrique	386	315	0, 82
11	Ac. Isocitrique	337	252	0, 75
	Acidité totale	2190	1321	0, 60

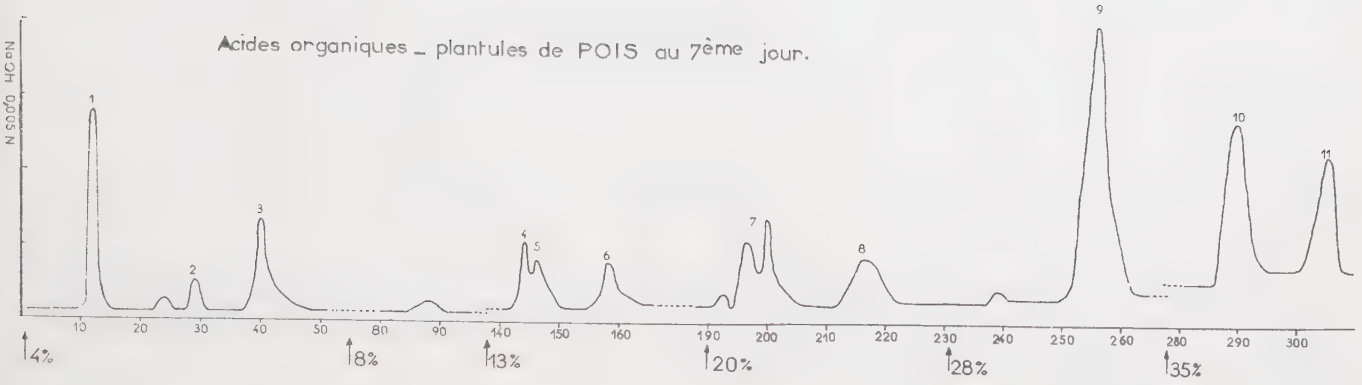


Fig. 10 -

- Analyse et caractérisation des acides

- Acidité totale

Les mêmes remarques que celles concernant l'acidité totale de l'expérience " Radis" sont à faire ici; l'acidité retrouvée en fin d'expérience est inférieure de 11 à 14% par rapport à celle qui fût dosée sur l'effluent cationique.

- Caractérisation des acides

Les acides ont été caractérisés comme nous l'avons indiqué précédemment; sans revenir sur la caractérisation de chacun des acides, il faut malgré tout signaler le cas des acides n° 1 et n° 8.

Acide 1 - Cet acide est élué dans la même fraction que le premier de l'expérience "Radis" et nous pensions qu'il s'agissait de l'acide acétique;mais,bien qu'il soit en quantité relativement importante nous n'avons jamais pu obtenir une réaction d'identification positive par la méthode que nous avons déjà indiquée.

Acide 8 - Cette acide donne, par analyse chromatographique, 2 spots, l'un très important, de Rf 0,41/0,42, l'autre assez mal délimité et de faible intensité aprés révélation, de Rf 0,04/0,07. Ces caractéristiques d'une part et le moment d'élution de cette fraction hors du gel de silice nous font conclure à la présence d'acide oxalique en petite quantité dans la fraction acide Glycolique.

IV - INTERPRETATION DES RESULTATS

RADIS

Le bilan azoté montre qu'au cours de la germination et des premiers stades de croissance, la quantité d'azote total ne varie pas, ce qui ne saurait nous étonner puisqu'il n'y a pas d'apport exogène d'azote. Ces résultats sont en rapport avec la courbe de croissance pondérale de 30 plantules exprimée par les résultats suivants : (en gramme)

		22 h.	44 h.	69 h.	90 h.
Témoin	Poids frais	0, 686	0, 687	1, 115	2, 012
	Poids sec	0, 322	0, 275	0, 266	0, 272
Tétracycline 100 µg/ml	Poids frais	0, 651	0, 688	0, 844	1, 583
	Poids sec	0, 324	0, 299	0, 288	0, 281

Les poids secs restent sensiblement constants et voisins de 0, 300g.

Par contre la quantité d'azote soluble augmente régulièrement, du stade graine au stade "plantule de 90 heures"; l'antibiotique exagère encore ce phénomène (0, 818 au lieu de 0, 675 à la 22ème heure, et 1, 284 au lieu de 0, 941 à la 90ème). La différence entre N aminé et N soluble provient de la teneur des tissus en polypeptides solubles dont certains sont détectables sur les chromatogrammes, sans qu'ils aient pu toutefois être identifiés.

Ces résultats impliquent qu'il y a seulement une transformation des protéines suivant le schéma général :

Protéines de réserve ⟶ acides aminés ⟶ Protéines de la plantule, la quantité d'azote total ne variant pas sensiblement puisqu'il n' y a pas d'apport d'azote extérieur.

L'accumulation d'azote soluble et aminé sous l'action de l'antibiotique ne peut se concevoir que de deux façons : la protéolyse est accélérée sous l'effet de l'antibiotique, ou bien la protéogénèse est bloquée à partir des amino-acides libres.

L'accélération de la protéolyse ne saurait, à priori, se traduire par une diminution de croissance, pondérale ou dimensionnelle des tiges et des racines. Or, sous l'effet de la Tétracycline, l'élongation est la suivante.

(en mm. moyenne sur 30 échantillons)		44 h.	69 h.
Témoin	Racines	6, 90	23, 11
	Tiges	5, 28	8, 42
Tétracycline 100 µg/ml	Racines	4, 46	11, 44
	Tiges	3, 77	5, 61

Cette diminution ou retard de croissance montre que l'action de l'antibiotique doit être recherchée au niveau du stade de synthèse des protéines à partir des amino-acides libres.

L'accumulation des acides aminés sous l'effet de l'antibiotique est très importante dans les premières heures (près de 3 fois plus d'N aminé à la 22ème heure), puis le taux de ces composés tend à se rapprocher de celui du témoin (1,4 fois plus seulement à la 90ème heure).

Enfin, le dosage des acides aminés indique que l'évolution de chacun ne se fait pas dans les mêmes proportions que celle des autres.

Si nous notons, entre parenthèses, l'accumulation par rapport au témoin à la 22ème et 90ème heure, nous avons les résultats suivants :

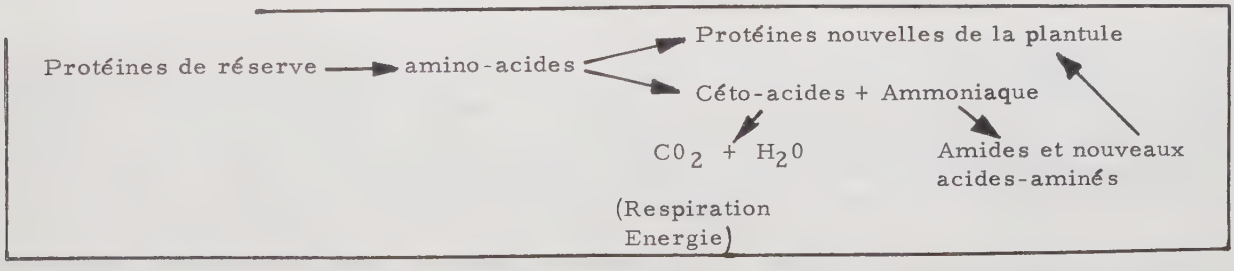
Glycocolle (12 et 0,7)
Alanine (2 et 3)
Valine (5 et 1,3)
Leucine (4 et 1,3)
Sérine (2 et 1,26)
Thréonine (13 et 1,25)
Cystine (3 et 0,9)
Ac. Aspartique (5,2 et 1,6)
Ac. Glutamique (1,76 et 1,16)

Asparagine (1,76 et 1)
Glutamine (5,2 et 1,1)
Ac. γ amino-butyrique (6 et 0,9)
Arginine (2,5 et 0,63)
Histidine (5,2 et 1,12)
Lysine (12 et 1)
Proline (1,5 et 2,6)
Tyrosine (2 et 1,3)

Au 1er jour de croissance, l'augmentation varie de 2 à 10 fois environ suivant la qualité de l'acide; si l'on supposait une utilisation, sans transformation, de chaque amino-acide dans la formation des protéines de la plantule, il faudrait admettre que certains de ceux-ci, thréonine ou lysine par exemple, auraient une véritable difficulté à être intégrés dans une molécule protidique. D'une autre manière nous pourrions également conclure que la lésion biochimique provoquée par l'antibiotique n'affecte pas la synthèse de toutes les protéines mais de quelques unes seulement.

Le problème est évidemment plus complexe puisque certains de ces amino-acides seront transformés en autres métabolites aminés ou non.

Webster donne, de la transformation des protéines de réserve lors de la germination, le schéma suivant :



et ce même auteur indique la probabilité d'une compétition pour les amino-acides entre le mécanisme pour la synthèse des protéines et le mécanisme de transformation des amino-acides. Les acides aminés néoformés entrent eux-mêmes dans la formation des protéines de la plantule; il est ainsi difficile d'étudier leur métabolisme particulier.

Les éléments clefs de tout métabolisme protidique sont représentés par l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'alanine. Ces acides sont reliés directement ou dérivent du cycle de Krebs et leurs propres rapports sont excessivement étroits.

L'Alanine peut être formée soit par amination réductrice à partir de l'acide pyruvique, soit par transamination entre l'acide glutamique et l'acide pyruvique. Webster et la plupart des auteurs pensent que la formation par transamination est la plus importante tout au moins dans la période de germination, période de transformation des acides aminés où l'apport exogène d'azote est à peu près nul.

L'alanine des plantules de 22 heures et de 90 heures proviendra de l'hydrolyse des protéines de réserve et de la transformation de l'acide glutamique par transamination avec l'acide pyruvique :

Ac. Glutamique + Ac. Pyruvique $\rightleftharpoons$ Acα Cétoglutarique + Alanine

Lorsque la graine a été soumise à l'action de l'antibiotique, on note à la 22ème et 90ème heure une accumulation importante d'alanine (2 et 3 fois). Si nous considérons la réaction enzymatique de transamination, une charge d'alanine, libéré par protéolyse et non utilisé dans la protéogénèse pourra provoquer, par équilibre, une augmentation du taux d'ac. glutamique et d'acide pyruvique et une diminution de la quantité d'acideα cétoglutarique. Ceci correspond aux résultats expérimentaux.

La formation d'alanine par amination réductrice directe de l'acide pyruvique :

$$\text{Ac. Pyruvique} + NH_4^+ \underset{1/2\ O_2}{\overset{H_2}{\rightleftharpoons}} \text{Alanine}$$

doit également faire conclure à une augmentation d'acide pyruvique dans le cas d'une accumulation d'alanine, ce que contrôle également l'effet de la Tétracycline.

Le deuxième système de transamination, à la base de la formation de l'Acide Aspartique :

Ac. Glutamique + Ac. Oxaloacétique $\rightleftharpoons$ Ac. Aspartique + Ac.α Cétoglutarique, nous conduit aux mêmes conclusions. L'acide aspartique des plantules traitées s'accumule d'une façon importante à la 22ème heure (5, 2 fois) et reste encore à la 90ème heure en concentration supérieure à celle du témoin (1, 6 fois). A cette augmentation devrait correspondre une diminution de l'acide α cétoglutarique et une augmentation des acides glutamique et oxaloacétique. Ceci est conforme aux résultats expérimentaux en ce qui concerne l'acide glutamique et l'acide αcétoglutarique; l'ac. oxalo-acétique n'a pas été dosé.

Selon Webster, une 2ème voie peut conduire à la formation d'acide aspartique : l'amination directe de l'acide fumarique :

$$H00C - CH = CH - C00H + NH_3 \longrightarrow H00C - CH_2 - \underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle |}{CH_2}} - C00H$$

Dans les conditions de nos expériences, l'accumulation de l'un des composés devrait provoquer une accumulation des deux acides, à la 90ème heure on ne constate qu'une augmentation du taux d'acide aspartique, alors que l'acide fumarique est en quantité très faible par rapport au témoin, ainsi que les acides les plus voisins auxquels il peut donner naissance, les acides malique et succinique. Le manque de relation entre ces deux métabolites apparait ici évident; ce mode de formation de l'acide aspartique dans le Radis en début de croissance, doit être , s'il existe, très secondaire.

Asparagine et Glutamine. La formation de la glutamine à partir de l'ac. glutamique et d'ammoniaque semble avoir été précisée par la découverte d'enzyme catalysant cette réaction dans *Lupinus albus* (Denes et Gazda 1953) et dans ***Pisum sativum*** (Webster et Varner 1955). Ces derniers auteurs ont d'autre part indiqué une possibilité de formation enzymatique d'asparagine par amidation directe de l'acide aspartique. Enfin Mardashev et Lestrovaja, puis Schaffner et Grabow *(Saccharomyces cerevisiae)* montrent que l'asparagine peut être synthétisée par transamidation suivant la réaction :

Ac. Aspartique + Glutamine $\rightleftharpoons$ Asparagine + Ac. Glutamique

Si l'on considère l'évolution du taux de ces amino-acides sous l'action de la Tétracycline, et surtout après 20 heures de germination, il apparaît que la formation par amidation directe :

$$\text{Ac. Glutamique } (\times 1,76) + NH_4^+ \longleftrightarrow \text{Glutamine } (\times 5,2)$$

$$\text{et Ac. Aspartique } (\times 5,2) + NH_4^+ \longleftrightarrow \text{Asparagine } (\times 1,76)$$

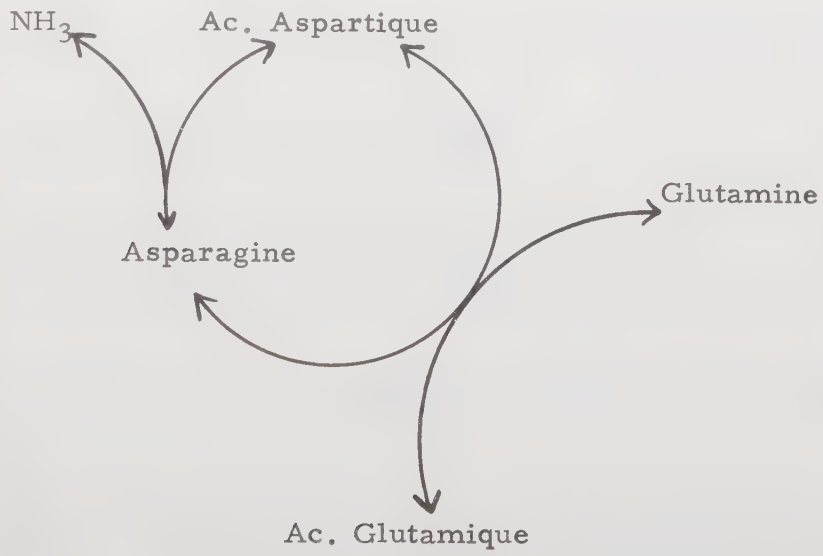
est moins probable que par transamidation; plus exactement, l'ammoniaque libéré par désamination oxydative après hydrolyse des protéines, ne doit être introduit dans les groupes amidés que par une seule de ces réactions.

Si nous examinons les taux des acides aspartique et glutamique, ainsi que ceux de leurs amides chez les seuls échantillons témoins "Graine" et "Plantule de 22 h.", nous voyons qu'au cours de la germination, s'accumulent acides aspartique et glutamique, glutamine;au contraire, la quantité d'asparagine, diminue d'une quantité équivalent à peu près à celle de l'augmentation de la glutamine. Si nous admettons le transfert des groupements amidés par transamidation, suivant le schéma précédemment indiqué, le groupement amidé de l'asparagine servira à la formation de la glutamine et d'une partie de l'acide aspartique. Dans ce premier stade il ne s'agit que d'un transfert de groupe amidé.

L'antibiotique augmente la teneur en azote amidé; comme il n'y a aucun apport d'azote exogène, celui-ci ne peut provenir que de l'azote ammoniacal libéré par désamination oxydative qui sera en quantité d'autant plus importante qu'il y aura une plus grande quantité d'acides aminés libres; c'est ce que l'on constate lorsque la graine a été traitée par la Tétracycline.

Si l'on considère les deux réactions d'amidation directe permettant la mise en réserve de l'azote ammoniacal, l'accumulation des différents métabolites fait apparaître comme plus plausible la formation d'asparagine à partir de l'acide aspartique.

En résumé, la mise en réserve de l'azote ammoniacal se ferait selon un cycle aboutissant à la formation de glutamine, selon le schéma :



La conception d'un cycle permettant la mise en réserve de l'azote ammoniacal sous forme de Glutamine par l'intermédiaire de l'Asparagine pourrait à la rigueur s'opposer aux deux conceptions suivantes :

1/ La première formation d'amide par voie enzymatique connue fut celle de la glutamine à partir de l'acide glutamique, réaction réversible sous l'action d'une diastase nécessitant un co-facteur métallique, le Magnésium, et la présence d'Adénoside triphosphate (Webster). Pendant un certain temps cette même réaction ne put être obtenue à partir de l'acide aspartique de telle sorte que la formation de la glutamine apparaissait comme le mécanisme essentiel de l'entrée de l'N ammoniacal sous forme amidée. Par la suite Webster et Varner (1955) montrent qu'au cours de la germination du Lupin, le C_{14} de l'acide aspartique se retrouve dans l'asparagine. Nelson et Krotkow (1956) expérimentent sur des Haricots et tirent les mêmes conclusions. Yamamoto observe que les axes hypocotyles de *Vigna sesquipedalis* mis en contact pendant 3 heures avec de l'acide aspartique et de l'ammoniaque, quadruplent leur teneur en asparagine. Le système enzymatique nécessite encore ici de l'A T P et du Mg^{++} . Mis à part le dernier travail, toutes les recherches ont été entreprises sur un matériel végétal à réserves protéiniques abondantes (Pois, Lupin, Haricot).

Il est ainsi certain que l'asparagine peut être formée à partir de l'amino-acide correspondant, et rien ne permet de donner un ordre préférentiel à la formation de la glutamine.

2/ Le système de transamidation observé par Mardashev et Lestrovaja ne présente pas la simplicité de la réaction équilibrée que nous avons précédemment indiquée; selon Venekamp, celle-ci correspond à une série de transformations et d'échanges qu'il schématise ainsi :

a) Transamination entre les acides aspartique et glutamique, et les céto-acides correspondants.

b) Captation de l'ammoniaque par un acide cétonique, sous forme d'amide, l'acide oxaloacétique donnant l'acide cétosuccinamique :

$$H00C\text{-}CH_2\text{-}C0\text{-}C00H + NH_3 \longrightarrow NH_2\text{-}C0\text{-}CH_2\text{-}C0\text{-}C00H$$

c) Transamidation entre l'acide succinamique et la glutamine pour former l'asparagine et l'acide αcétoglutaramique.

d) Libération de l' NH_3 par hydrolyse restituant l'acide αcétoglutarique.

Quoi qu'il en soit, le bilan de l'opération revient à une opération de transamidation entre les amides et les acides correspondants.

En définitive, il ne semble pas que l'hypothèse d'un cycle d'introduction de l'N ammoniacal dans les amides s'oppose, mais au contraire qu'il s'ajoute aux connaissances acquises sur la formation de ces composés.

Acide γaminobutyrique. Chez les végétaux supérieurs, l'acide glutamique peut être décarboxylé en ac. γ aminobutyrique, réaction enzymatique dûe à un système diastasique, la décarboxylase-glutamique. La dégradation ultérieure de l'acide γ aminobutyrique conduit, selon Webster, à la formation d'acide succinique.

Si nous suivons l'évolution de cette chaîne métabolique: Ac. glutamique $\longrightarrow$ Ac. γaminobutyrique $\longrightarrow$ Ac. succinique, nous voyons, chez les plantules témoins, que le taux initial, dans la graine, d'acide γ aminobutyrique diminue légèrement dans les premières heures de la germination, puis augmente dès le 3ème jour de croissance; la formation de cet acide n'apparaît que tardivement, après, semble-t-il, que l'acide glutamique ait contribué à la formation d'acides aminés plus essentiels à la formation des protéines de la jeune plantule.

L'évolution du taux d'acide succinique se fait dans le même sens que celui de l'amino-acide (diminution à la 22ème heure, augmentation à la 90ème).

Le blocage de la protéogénèse par la Tétracycline provoque une augmentation du taux des amino-acides, issus notamment de la transformation, sous une forme ou une autre, de l'acide glutamique; l'acide γ amino-butyrique s'accumule dès la 22ème heure (de 25mg dans la graine ——→ 107 mg) puis sa quantité décroît pour ne plus se trouver à la 90ème heure qu'à une concentration légèrement inférieure à celle du témoin. L'acide succinique subit, ici encore, une évolution exactement parallèle à celle de l'amino-acide.

Cette expérience semble bien confirmer la présence d'une telle chaine métabolique mettant en relation l'acide glutamique et l'acide succinique par l'intermédiaire de l'acide γ aminobutyrique.

En ce qui concerne les autres acides aminés, les facteurs inconnus sont trop nombreux pour nous permettre une interprétation des troubles que provoque l'effet antibiotique sur leur évolution. Nous ne pouvons que constater, chez les plantules traitées, une accumulation importante de ces amino-acides dès les premières heures de germination, accumulation s'opérant à des degrés divers selon les composés envisagés.

L'accumulation des acides basiques semble persister plus longtemps que celles des acides aminés que nous avons déjà envisagés. De tous, il apparaît que c'est la Proline qui reste le plus longtemps en concentration supérieure à celle que l'on peut observer dans les lots témoins. L'expérience montre également une accumulation de peptides dans les extraits de plantules traitées (taches "d", "e" et "f" sur les chromatogrammes " Plantules traitées 22ème h. ")

En résumé, l'effet de l'antibiotique provoque une accumulation importante des amino-acides dans les premières heures de la germination; puis, rapidement le taux d'acides aminés des lots traités se rapproche de la normale à l'exception de quelques amino-acides : alanine et proline notamment.

Ceci laisse supposer que certains amino-acides ont une difficulté à trouver place dans leur modèle protidique, ou plus exactement que les troubles provoqués par la Tétracycline et affectant la protéogénèse n'empêchent pas la synthèse de toutes les protéines mais de certaines seulement.

Acides organiques. Le sort des acides organiques est intimément lié au métabolisme azoté et nous avons déjà envisagé le rapport existant entre certains amino-acides et acides organiques du cycle de Krebs (Ac. α cétoglutarique, pyruvique, succinique).

L'examen du taux des acides organiques chez les plantules témoin montre une diminution assez importante de leur taux au cours des 20 premières heures de germination. La concentration en acides diminue sauf en ce qui concerne celle des acides pyruvique et cis-aconitique qui reste à peu près identique à celle que l'on trouve dans la graine.

La quantité d'acide α cétoglutarique double dans le même laps de temps. Un seul acide se comporte résolument à l'inverse des autres, l'acide glycolique dont la concentration augmente de 6 fois dans les premières heures de germination.

La disparition d'une quantité importante d'acides doit, semble-t-il, être rapprochée du phénomène respiratoire. Nous avons en effet montré que le quotient respiratoire (Q.R.) était, à la 20ème heure, supérieur à 1 (1,27); le substrat oxydé ne peut, dans ces conditions, être ni un sucre, ni une chaîne hydrocarbonée, mais uniquement des composés riches en oxygène, en l'occurence des acides organiques (avec l'acide succinique le Q.R. serait de 1,14 et 1,33 avec l'acide citrique).

Ensuite, à la 90ème heure, le taux de ces acides augmente d'une façon très importante. Durant ce temps, le Q.R. diminue et devient inférieur à 1 (0,76). L'évolution du Q.R. est liée à l'apparition de produits d'hydrolyse des réserves huileuses, dont l'augmentation du taux de l'acide acétique et l'apparition d'acide acétoacétique sont les témoins. Le substrat d'oxydation de la respiration est, à ce stade constitué par les chaînes hydrocarbonées des acides gras.

Chez les plantules traitées, les acides organiques s'accumulent dès le premier jour; cette augmentation doit être en rapport avec le métabolisme azoté et l'accumulation importante des amino-acides dont les liens avec le cycle de Krebs sont nombreux. La décharge d'acides aminés dans le milieu cellulaire se répercute sur la teneur en acides du cycle de Krebs; l'accumulation est d'autant plus importante que les acides sont en relation plus directe avec l'acide pyruvique (3 fois plus). Dans l'ordre décroissant de leur augmentation de concentration par rapport à celle des acides dans les lots témoins, on trouve :

acide citrique > ac. cis-aconitique > ac. isocitrique
ac. malique > ac. fumarique ⩾ ac. succinique

L'acide ∝cétoglutarique ne varie pas.

L'augmentation relativement plus importante des acides dicarboxyliques par rapport aux acides tricarboxyliques (les premiers possèdant un pourcentage d'oxygène inférieur à celui des seconds) peut expliquer la diminution du Q.R. chez les plantules traitées.

D'autre part, il ne semble pas que l'accumulation de ces acides puisse être attribuée à une oxydation moins importante que chez les témoins, puisqu'à ce stade la respiration des deux lots présente la même intensité.

Acide Glycolique. Cet acide se forme en quantité abondante au cours de la germination et un traitement de la graine par l'antibiotique exagère encore cette production. Par la suite, la concentration de cet acide s'abaisse. L'origine et le rôle de cet acide n'apparaîssent pas clairement.

Son accumulation chez les témoins correspond à la chute du taux de la plupart des autres acides organiques, mais peut-on établir une relation entre ces deux phénomènes. La formation de cet acide serait dans ce cas en rapport avec le phénomène respiratoire et représenterait un produit d'oxydation incomplet des substrats oxydés, c'est à dire des acides organiques. Il n'est pas de travaux à notre connaissance, qui permettent une telle supposition.

Par ailleurs, la présence d'acide glycolique est en relation avec la formation de glycocolle; ce fait a été observé par un certain nombre d'auteurs dont Tolbert et coll. qui démontrent, chez les plantes vertes, une formation de glycocolle suivant le schéma :

$$\text{Acide Glycolique} \xrightarrow{-2H} \text{Ac. Glyoxylique} \xrightarrow{+NH_3} \text{Glycocolle}$$

En supposant cette réaction réversible, la formation d'acide glycolique à partir de Glycocolle ne peut être retenue dans le cas du Radis, la graine ne renfermant pratiquement pas cet amino-acide à l'état libre.

Par contre les travaux de Weissbach et Horecker apportent une idée plus précise quant à la formation de l'acide glycolique. Ces auteurs ont montré qu'un extrait soluble de feuilles d'Epinard était capable d'incorporer 90% du I-C^{14} du Ribose 5 phosphate dans le glycocolle et expliquent cette transformation par les étapes suivantes :

Ribose 5 P ⟶ Ribulose 5 P ⟶ Ac. Glycolique ⟶ Ac. Glyoxylique ⟶ Glycocolle

Actuellement le mode de formation des nucléoprotéines est mal connu, mais on sait cependant qu'au cours de la germination et simultanément à la protéolyse existe un remaniement, une hydrolyse des nucléoprotéines avec libération d'acide ribonucléique notamment, dont le ribose phosphate par dégradation pourra fournir entre autre de l'acide glycolique.

A ce stade il apparaît que l'utilisation ultérieure de cet acide soit lente puisque son accumulation est relativement importante. Si l'on envisage les métabolites auxquels il pourrait donner naissance d'une façon plus ou moins directe les résultats du tableau suivant (quantités exprimées en milli-molécules pour 100 g. de poids sec) montrent que la quantité de glycocolle est faible en regard de celle de l'acide.

	Graine	T 22 h.	T 90 h.	Ant. 22 h.	Ant. 90 h.
Ac. Glycolique	0, 47	2, 87	2, 65	3, 885	0, 77
Glycocolle	0	0	0, 4	0, 16	0, 26
Sérine	0, 1	0, 5	0, 92	1	1, 15

Or glycocolle et sérine peuvent également provenir, et certainement en grande partie de l'hydrolyse des protéines de réserve, de telle sorte que l'acide glycolique n'apparaît pas comme uniquement destiné à la formation ultérieure de ces amino-acides, tout au moins dans le temps de la germination et des premiers stades de croissance de la plantule. De plus, nous n'avons pas pu établir la présence d'acide glyoxylique qui devrait apparaître au cours d'une telle transformation.

P O I S

En dehors de toute considération purement botanique, le Pois représente un matériel végétal biochimiquement et pratiquement fort différent du Radis, par la nature de ses réserves cotylédonaires(protidiques et hydrocarbonées) et par la facilité à séparer les cotylédons de la partie végétative. Schématiquement on peut considérer les cotylédons comme le siège de la protéolyse et la partie végétative de la plantule comme celui de la protéogénèse.

Le bilan azoté montre que les parties cotylédonaires témoins s'appauvrissent progressivement en azote total et, d'une façon encore plus rapide, en azote protidique. Dans les cotylédons mis en contact avec l'antibiotique, cette évolution est beaucoup plus lente (la réserve d'azote protidique, est au IIème jour, le double de celle que l'on trouve chez les témoins).

Puis l'azote soluble est transféré dans les plantules; l'évolution du taux d'N protidique et des courbes de croissance montrent que la protéogénèse est beaucoup plus lente chez les plantules traitées que chez les témoins; chez les premiers on observe même au huitième jour une accumulation relative d'azote plus importante que chez les témoins, ce que font apparaître les rapports N sol./N prot.; ces rapports tendent par la suite à s'égaliser.

En résumé, l'ensemble du bilan azoté et des courbes de croissance, montre, que chez les individus soumis initialement à l'action de la Tétracycline, la protéogénèse est fortement ralentie dans les tissus en voie de division active c'est à dire chez l'embryon puis la jeune plantule; en réaction, la protéolyse des réserves cotylédonaires est ralentie; ces résultats confirment nos observations sur le Radis.

Au cours de ces expériences les amino-acides ont été analysés et dosés sur l'ensemble de la partie soluble des cotylédons et des plantules au temps 0 et 7 jours, de telle sorte qu'il est difficile d'envisager l'étude de quelque métabolisme particulier.

Cependant, les résultats indiquent, ici encore, que le taux des amino-acides n'est pas identique dans les lots traités et témoins. Les échantillons traités renferment une quantité plus importante d'alanine, de sérine, d'histidine et de proline ainsi que des amides (glutamine et asparagine), et par contre un peu moins des autres amino-acides. Ceci est caractéristique d'un désordre important dans la protéogénèse.

Lorsque l'on compare les fractions N aminé solubles des deux espèces Pois et Radis, on constate certaines analogies quant à la qualité et la quantité de différents acides aminés; alanine, sérine , valine, leucine, proline, histidine par exemple sont en concentrations sensiblement identiques dans les tissus des deux espèces. Par contre les extraits de Pois sont particulièrement riches en thréonine, arginine et acides dicarboxyliques.

En ce qui concerne l'azote amidé, la glutamine est en faible quantité par rapport à l'asparagine, alors que ces rapports sont inverses chez le Radis. Ceci laisse entrevoir entre les deux espèces quelques différences essentielles au cours de la transformation de certains amino-acides et notamment de celle des amides. Dans le cas du Radis nous avons envisagé leur formation par amidation directe de l'acide aspartique puis un transfert du groupe amidé donnant naissance à la glutamine.

Chez le Pois traité, l'accumulation des deux amides, correspondant à une légère chute du taux des acides carboxyliques, ne laisse pas d'autres alternatives qu'une formation par amidation directe des acides aspartique et glutamique. Cette formation est d'ailleurs classiquement admise; les enzymes responsables de ces biosynthèses ont été mis en évidence dans plusieurs végétaux supérieurs et plus particulièrement étudiés chez le Pois et le Lupin. Il faut toutefois noter ici la prédominance de l'asparagine sur la glutamine surtout en regard des quantités d'acides dicarboxyliques qui leur correspondent.

Acides organiques. Les seules accumulations dûes à l'action antibiotique, et constatées au 7ème jour, sont celles de l'acide pyruvique et de l'acide succinique. Les autres acides sont en concentration inférieure à celle des acides " témoins" (ac. Tricarboxyliques : 80%, autres acides du cycle de Krebs : 30 à 40%).

L'accumulation d'acide pyruvique est certainement en relation avec celle de l'alanine et de la sérine. Par contre nous ne voyons pas la raison de l'augmentation du taux d'acide succinique.

La diminution de quantité des acides du cycle de Krebs est certainement à rapprocher de l'action dépressive que nous avons précédemment constatée sur le phénomène respiratoire. Nous n'avions pas expérimenté sur le Pois mais sur la Lentille pour des raisons pratiques que nous avons déjà exposées. Nous pensons toutefois que la parenté botanique de ces deux espèces nous autorise à extrapoler les résultats et ceci d'autant plus que la Tétracycline provoque une inhibition de la respiration à partir du 3ème ou 4ème jour sur toutes les espèces que nous avons étudiées; ce qui apparaît ainsi comme un phénomène général.

L'intensité de la respiration est une fonction directe de la quantité d'énergie utilisée par l'organisme en croissance; or dans nos conditions d'expérience, cette quantité d'énergie utilisée se traduira également par une diminution totale du poids sec de l'individu puisqu'il n'y a aucun apport exogène d'éléments plastiques ou énergétiques (le seul apport de CO_2 doit être négligeable car jusqu'au IIème jour l'activité photosynthétique est assez peu importante).

Au cours des II premiers jours de développement de la plantule à partir de ses substances de réserve, les poids secs moyens de 10 individus (cotylédons + plantule) sont les suivants :

		temps 0	4ème j.	8ème j.	11ème j.
	Témoins	1, 535	1, 580	1, 314	1, 087
	Tétracycline (30 µg/ml)	1, 535	1, 606	1, 357	1, 355

La diminution de poids, par oxydation des substances de réserve hydrocarbonées, est plus rapide chez les témoins que chez les traités.

En résumé, l'effet initial de l'antibiotique provoque un ralentissement de croissance de la plantule qui s'accompagne d'une diminution du taux des acides organiques, d'une diminution de l'intensité respiratoire et d'une utilisation plus lente de ses substances de réserve énergétiques et plastiques.

CULTURE DE TISSUS DE TOPINAMBOUR

L'évolution des quantités d'azote protidique et d'azote soluble dans les cals témoins (voir graphique fig. 11) montre qu'après une période latente (une quinzaine de jours) la quantité d'azote protidique augmente rapidement jusqu'au 40ème jour environ, date après laquelle cette formation diminue d'intensité ; l'évolution du taux de l'azote soluble est sensiblement identique.

D'autre part le graphique montre que, dans les cals placés sur milieu nutritif renfermant de la Tétracycline, la formation d'azote protidique est retardée par rapport à celle des cals témoins et qu'elle se réalise par la suite d'une façon assez lente.

L'augmentation de l'azote protidique est exactement en rapport avec les courbes de croissance telles que les exprime le tableau suivant.

Poids sec d'un cal en milligrammes

	Tubercule	11ème j.	20ème j.	31ème j.	45ème j.
Témoin	40	51, 06	77, 29	136, 38	136, 43
Tétracycline	40	38, 71	54, 47	69, 84	97, 63

En somme, on peut observer trois phases dans le développement de la culture "in vitro" de parenchymes vasculaires de Topinambour.

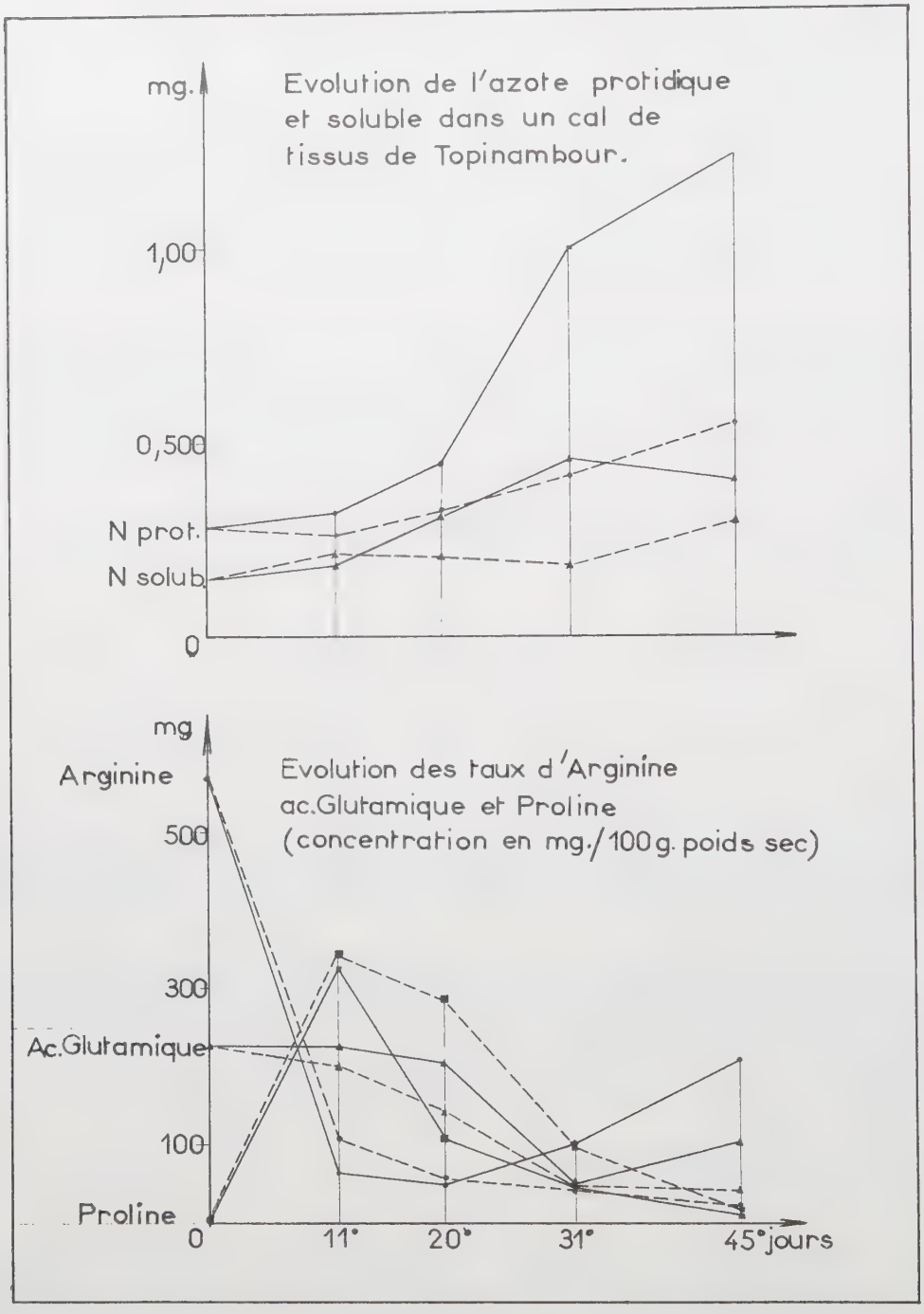

mg.
Evolution de l'azote protidique et soluble dans un cal de tissus de Topinambour.
1,00
0,500
N prot.
N solub.
0
mg
Arginine
Evolution des taux d'Arginine ac.Glutamique et Proline (concentration en mg./100g. poids sec)
500
300
Ac.Glutamique
100
Proline
0
11°
20°
31°
45° jours

Fig. 11

- la première phase correspond à une adaptation du fragment de tubercule transplanté (10 jours environ) au cours de laquelle la formation de protéines est très faible; cette période doit correspondre à une transformation des amino-acides.

- la deuxième phase, du IIème au 30ème jour, est caractérisée par une activité intense de la protéogénèse et en corollaire par une croissance rapide des cals.

Dans la dernière phase, 35ème au 45ème jour, croissance et protéogénèse sont notablement réduites; à cette dernière phase correspond également une diminution du taux des composés azotés solubles.

Dans le cas des cultures soumises à l'action de l'antibiotique, on observe que la phase latente est plus longue. Au cours de la deuxième période la croissance est lente et la protéogénèse réduite ; l'augmentation du taux des composés azotés solubles n'est sensible qu'à partir du 30ème jour. La 3ème phase n'apparaît pas encore à la fin de l'expérience, c'est à dire au 45ème jour.

Le tubercule de Topinambour est, durant la période hivernale et au début du printemps, particulièrement riche en arginine (Duranton 1958 a); c'est à cette seule époque qu'ont été faites, en laboratoire, les cultures *" in vitro"* de parenchymes. Duranton et Morel (1958) ont montré que l'arginine constituait chez cette espèce la réserve azotée soluble la plus importante, et d'autre part que, dans les cultures *" in vitro"* cet amino-acide disparaissait très rapidement au cours des 6 premiers jours en même qu'apparaîssaient la proline et l'hydroxyproline et qu'augmentaient les quantités d'alanine, d'acides glutamique, aspartique et de leurs amides. Enfin, par l'utilisation d'isotopes ^{14}C et ^{15}N, Duranton(1958 b, c) montre que la Proline est formée à partir de l'Arginine suivant le schéma :

Arginine ⟶ Urée + Ornithine
↓
Semi-aldéhyde glutamique
↓
Ac. Glutamique
↓
Ac. Pyroline carboxylique
↓
Proline
↓
Hydroxyproline

Les expériences de ces auteurs intéressent la première phase de développement de la culture de tissus. Le graphique "Evolution des taux d'arginine" met effectivement en évidence la chute du taux d'arginine et l'augmentation corélative de celui de la proline; par contre nous n'avons pas observé d'accumulation d'acide glutamique.

Si l'on replace l'évolution des trois amino-acides (ac. glutamique, arginine et proline) dans les phases de développement, nous constatons dans les cals témoins :

- au cours de la première phase, une diminution rapide du taux d'arginine, une augmentation de la quantité de proline; la concentration d'acide glutamique ne varie pas.

- au cours de la deuxième phase (croissance et protéogénèse intense), une chute du taux de ces amino-acides.

- dans la dernière phase (ralentissement de croissance), une augmentation de l'arginine et, à un moindre degré, d'acide glutamique.

Chez les lots traités, l'antibiotique provoque, lors de la première phase, un ralentissement de la transformation d'arginine en proline; mais finalement, la quantité de proline est à peu près identique à celle que l'on peut rencontrer chez le témoin; toutefois, lors de la deuxième phase de développement l'utilisation de cet acide est affectée puisqu'il persiste dans le milieu en concentration nettement supérieure à celle du témoin; comme ce phénomène se situe dans la période de protéogénèse intense, il apparaît que c'est à une difficulté d'entrer dans les molécules protidiques que l'on doit attribuer son accumulation.

En dehors de la proline, il faut également noter, en fin d'expérience une accumulation d'autres amino-acides : glutamine, valine et, à un moindre degré, leucine.

CHAPITRE V

ACTION DES TÉTRACYCLINES SUR LE MÉTABOLISME DES PIGMENTS ACÉTONOSOLUBLES

Parmi les anomalies apparaissant sous l'action des antibiotiques, les troubles qui affectent la chlorophyllogénèse sont certainement les plus spectaculaires. L'un des premiers, Von Euler montre que des semences de Seigle ou d'Orge, trempées dans une solution de Streptomycine à 1 mg/ml, germent en donnant une première feuille qui reste blanche à la partie inférieure. Des observations identiques furent faites par la suite sur des plantules issues d'autres graines ayant subi le même traitement : Laitue, Fève, Radis, Cresson. Schöpfer et collaborateurs étudient l'action de la Streptomycine et du Chloramphénicol sur la germination du Pois, de l'Avoine et du Blé, font les mêmes remarques sur l'absence de pigmentation des jeunes plantules et précisent par dosage la diminution des chlorophylles et des carotènes. Signol prend le problème sous l'angle cytologique et montre que la Dihydrostreptomycine provoque une déficience dans la formation des chloroplastes. Nétien, Sotty et Hutinel indiquent que les dérivés de la Tétracycline agissent dans un sens identique sur Colza, Lentille et Pois.

Ainsi des antibiotiques aussi différents chimiquement que la streptomycine et les tétracyclines provoquent une activité, visuellement identique. En réalité il apparait que des substances aussi diverses agissent en des points très différents de divers métabolismes, provoquant au niveau de ceux-ci des lésions biochimiques qui concourront par des voies diverses à un résultat en apparence identique se traduisant par un ou des troubles dans la formation des pigments.

Dans ce chapitre nous envisagerons, après l'exposé des techniques expérimentales, l'action des Tétracyclines en fonction des espèces végétales expérimentées et en fonction de l'état physiologique des plantules ou des tissus en culture.

I - TECHNIQUES EXPERIMENTALES : EXTRACTION, SEPARATION, CARACTERISATION ET DOSAGE DES PIGMENTS ACETONOSOLUBLES.

Nous définissons évidemment, par acétonosolubles et liposolubles les pigments chlorophylliens et caroténoïdes, cependant le terme "acétono" n'exclut pas la possibilité d'extraction des pigments à l'aide d'un autre solvant tel que l'alcool ou l'éther de pétrole par exemple. L'emploi de l'un ou l'autre solvant est dicté par la nature du matériel végétal à étudier ; la plupart du temps cependant, l'acétone hydratée représente le premier solvant utilisé pour l'extraction globale et c'est la technique générale que nous donnerons ici, nous réservant d'indiquer par la suite les modifications qui peuvent être apportées dans certains cas.

A - EXTRACTION.

D'une façon générale, les pigments ont toujours été extraits à partir de matériel végétal frais, ceci pour éviter des altérations risquant de survenir au cours de la dessication. Les prélèvements sont réfrigérés en même temps que le matériel nécessaire au broyage (température de l'ordre de 4°C) ; le broyage est réalisé en présence de carbonate de Calcium, soit dans un mortier en présence de sable lavé ou de verre pilé, soit dans un broyeur à hélice à récipient réfrigéré par un bain de saumure. La présence de Carbonate de Calcium facilite l'extraction et neutralise les acides organiques libérés, empêchant ainsi une transformation partielle de chlorophylles en phoeophytines. Ce broyat est extrait par un mélange acétone - eau (80-20) ; l'extraction acétonique est poursuivie sur un verre fritté jusqu'à extraction complète contrôlée au spectrophotomètre dans la longueur d'onde de 4.300 A. Cet extrait est global, renfermant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes.

B - PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS.

- Caractérisation. Celle-ci peut être faite en utilisant la chromatographie de partage sur papier suivant les méthodes de Douin ou de Bauer ; les chlorophylles sont repérées par leur couleur en lumière du jour, leur fluorescence (a : rouge sang ; b : rouge brique) en lumière ultra-violette sous lampe de Wood, ou, d'une façon plus précise par le spectre d'absorption de l'éluat éthéré de la fraction intéressante du chromatogramme. Cependant en ce qui concerne les chlorophylles a et b, la séparation n'est pas nécessaire pour le dosage lorsque l'on utilise la méthode de Comar et Zscheile (Smith et Benitez).

- Dosage. L'aspect chlorotique des plantules traitées par les tétracyclines peut être apprécié visuellement ; il est évident que cette appréciation est très primitive et nous avons, tout d'abord, essayé de chiffrer l'importance du phénomène par un dosage global et relatif des pigments chlorophylliens extraits ; ces mesures faites au photomètre de Meunier, sont relatives car l'expression des résultats est un pourcentage évalué par rapport aux dilutions d'un extrait acétonique témoin ; dosage global également, puisqu'il ne permet en rien de préjuger du rapport existant entre les différentes chlorophylles. Par la suite un dosage spectrophotométrique avec l'appareil Jobin et Yvon nous a permis de doser séparément et avec facilité les chlorophylles a et b.

1) Méthode colorimétrique : Les extraits acétoniques de pigments sont tels que les rapports :

$$\frac{\text{Poids de matériel frais extrait}}{\text{Volume de solvant}}$$

soient égaux.

Les produits d'extraction sont ensuite dosés colorimétriquement, à l'électrophotomètre de Meunier (écran n° 64) en comparaison avec des dilutions de la solution témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la quantité de chlorophylle (valeur 100), renfermée dans les témoins.

Cette méthode est assez succinte puisqu'elle ne donne pas de valeurs absolues mais relatives et, surtout, parce qu'elle ne permet aucune appréciation quant au rapport des chlorophylle a et chlorophylle b.

Le dosage relatif des chlorophylles a et b peut cependant être fait colorimétriquement sur les éluats acétoniques des bandes isolées d'un chromatogramme sur papier dont les techniques seront décrites plus loin.

De toute façon cette méthode par colorimétrie n'a été utilisée que pour des déterminations rapides et nous l'avons remplacée par la suite par une technique spectrophotométrique.

2) Dosage par spectrophotométrie selon Comar et Zscheile : Une partie aliquote de l'extrait acétonique est traitée par une quantité identique d'éther éthylique dépèroxydé (distillation sur chlorure stanneux) ; le mélange organique est additionné d'eau distillée qui dissoudra la plus grande partie de l'acétone ; deux autres lavages successifs entraineront la presque totalité de l'acétone ; l'extrait éthéré est déshydraté sur sulfate de sodium anhydre et les densités optiques sont mesurées au spectrophotomètre Jobin et Yvon dans les longueurs d'onde de 642,5, 660 et 624 mμ .

Nous avons trouvé dans certains cas, à 624 mμ , une absorption non négligeable et ne provenant pas uniquement des absorptions correspondant aux deux chlorophylles ; cette absorption supplémentaire est due à la protochlorophylle qui possède dans cette longueur d'onde un coefficient d'absorption dans l'éther éthylique de 39,9 g/l/1cm. Compte tenu des coefficients d'absorption des chlorophylles a et b d'une part, de la protochlorophylle* d'autre part, dans ces trois longueurs d'onde, les concentrations de ces trois composés pourront être déterminées, en milligrammes par litre, de la façon suivante :

$$\text{Chlor. a} = 9{,}93 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660} - 0{,}771 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5} - 0{,}03 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{624}$$

$$\text{Chlor. b} = 17{,}68 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5} - 2{,}76 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660} - 0{,}43 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{624}$$

$$\text{Protochlor.} = 24{,}93 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{624} - 2{,}55 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660} - 4{,}60 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5}$$

En ce qui concerne les dosages des chlorophylles a et b les corrections apportées par l'absorption propre à la protochlorophylle sont négligeables, tout au moins dans nos conditions d'expérience, et nous avons utilisé, pour le calcul des concentrations des chlorophylles, les formules proposées par Comar et Zscheile :

$$\text{Chlorophylle a (mg/l)} = 9{,}93 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660} - 0{,}777 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5}$$

$$\text{Chlorophylle b (mg/l)} = 17{,}6 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5} - 2{,}81 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660}$$

$$\text{Chlorophylle totale} = 7{,}12 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{660} + 16{,}8 \log \left(\frac{I_0}{1}\right)_{642{,}5}$$

Cette technique de dosage nécessite toutefois pour être très précise, une mesure des densités optiques comprises entre 0,20 et 0,80, limites entre lesquelles l'intensité d'absorption du spectre obéit à la loi de Beer - Lambert.

* Coefficient d'extinction (en g/l/1 cm)	624 mμ	642,5 mμ	660 mμ
Chlorophylle a (Zscheile et Comar)	14,2	16,3	102
Chlorophylle b (- id -)	11	57,5	4,5
Protochlorophylle (Koski et Smith)	39,9	1,3	0,2

C - PIGMENTS CAROTENOIDES.

La structure des nombreux pigments caroténoïdes est tellement voisine qu'il paraît difficile d'envisager une autre technique de séparation que chromatographique soit de partage sur papier, soit sur un absorbant. Nous indiquerons, après la préparation de l'extrait global des caroténoïdes, les différentes méthodes de séparation que nous avons utilisées puis la caractérisation de ces composés en même temps que leur dosage.

- Extrait total. L'extrait est préparé différemment suivant que l'échantillon renferme ou non de la chlorophylle.

Dans le cas de tissus achlorophylliens, graines par exemple, l'extrait acétonique est traité par une partie égale d'éther de pétrole en présence d'une faible quantité d'éther éthylique ou de méthanol. Deux ou trois extractions successives permettent d'entrainer tous les composés caroténoïdes. La phase éthérée est filtrée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée pour séparation chromatographique.

La présence de chlorophylles ou de leurs produits de dégradation est souvent gênante dans la séparation ultérieure des pigments caroténoïdes. Costes et Coic séparent les pigments chlorophylliens en les saponifiant ; une partie de la solution acétonique est utilisée pour le dosage des chlorophylles, l'autre est additionnée d'une solution de potasse dans le méthanol à concentration de 15 % (15 ml de solution alcaline pour 25 de solution acétonique) ; l'hydrolyse est poursuivie à température du laboratoire pendant 15 heures ; les chlorophylles sont dégradées en composés hydrosolubles et les xanthophylles estérifiées sont hydrolysées ; les caroténoïdes sont extraits de ce milieu par un mélange à parties égales d'éther éthylique déperoxydé et d'éther de pétrole. L'extrait éthéré est lavé deux fois par un double volume d'eau distillée. Il est nécessaire de ne pas agiter violemment les mélanges qui forment une émulsion très stable, celle-ci peut être rompue par addition de sulfate de sodium. L'extrait est finalement séché sur sulfate de sodium anhydre ; en milieu éthéro pétrolique seul, le sulfate de sodium adsorbe certains pigments (xanthophylles) et il est nécessaire d'ajouter à l'éther de pétrole un solvant polaire tel que l'éther éthylique ou du méthanol, pour entrainer tous les pigments lors d'un dernier rinçage du déshydratant.

L'extrait est ensuite concentré sous vide à température de 25°C jusqu'à réduction à un volume de 1 ml environ ; cette solution sera soumise aux séparations chromatographiques, sur papier ou sur gel de silice.

- Séparation chromatographique sur papier.

Nous avons utilisé les techniques suivantes :

a) Chromatographie ascendante de Douin sur papier Durieux 147 et Arches 302. Le papier est laissé, après dépôt en ligne du mélange à analyser, pendant une heure au moins dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau à température du laboratoire avant d'être soumis à l'action du solvant : méthanol à 99,5°.

b) Chromatographie descendante de Bauer sur papier Whatman n°4 ; le papier est desséché à 105°C avant l'emploi ; le chromatogramme est développé en atmosphère de vapeur d'éther de pétrole par le mélange : Benzène - Ether de pétrole - Acétone (10 - 2,5 - 2), la cuve de développement se trouvant en chambre froide à température de 4°.

Du point de vue séparation les deux méthodes donnent de bons résultats ; les composés sont mis en évidence par leur coloration propre en lumière du jour, leur fluorescence sous la lampe de Wood ou par la réaction de Carr et Price faite directement sur le chromatogramme.

Cependant la caractérisation et le dosage des pigments s'accomodent plus difficilement de telles méthodes car l'élution des taches nécessite parfois une quantité de solvant qui, sans être très importante, fournit une solution trop diluée pour une étude spectrophotométrique ; cet inconvénient peut toutefois être tourné en utilisant les éluats provenant de plusieurs chromatogrammes et les étudier après concentration. Afin de diminuer le nombre d'opérations (plusieurs chromatographies du même échantillon, élutions puis concentrations) nous avons recherché une méthode de séparation sur colonne d'adsorbant, nous réservant les méthodes de partage sur papier pour analyser certaines fractions obtenues par cette méthode.

- Séparation sur colonne d'adsorbant.

Le nombre des techniques utilisant des adsorbants est déjà si important qu'il paraît injustifié de proposer une nouvelle méthode. La plupart des techniques font appel aux oxydes, hydroxydes et carbonates de Calcium, de Magnésium ou d'Aluminium auxquels sont mélangées des poudres moins bien définies qualitativement telles que Kieselguhr, Célite, Hyflo-Supercel, dont le rôle entre autre, est de rendre la colonne plus perméable aux solvants et éluants. Nous nous sommes, pour notre part, très souvent heurtés à des aléas provenant des qualités de ces divers adsorbants dont les auteurs n'indiquent pas toujours les critères et essais qui conditionneraient des séparations reproductibles.

Nous utilisons le gel de silice ; cet adsorbant très utilisé pour le fractionnement de nombreux corps (acides aminés, basiques, acides organiques, lipides et acides gras par exemple) n'a pas à notre connaissance été utilisé pour la séparation des pigments caroténoïdes.

a) Préparation du gel. Le gel est préparé à partir de 4 ou 8 g d'acide silicique "Mallinckrodt", hydraté par 4,8 ml d'eau distillée pour 8 g de prise d'essai. La méthode de préparation du gel est identique à celle que nous avons décrite dans le chapitre "Acides organiques".

Après hydratation la silice est mise en suspension dans 50 ml d'éther de pétrole ; cette suspension forme de gros flocons mais son introduction dans le tube à chromatographie donne finalement une colonne très homogène pour la conduite des opérations ultérieures.

b) Préparation de la colonne. Nous utilisons des tubes à chromatographie de 350 mm de hauteur et de 7 ou 10 mm de diamètre suivant que l'on emploie 4 ou 8 g de silice et ceci en fonction de la quantité et de la nature des caroténoïdes à séparer. Le tube classique, possède à sa base une rondelle de verre fritté de faible épaisseur sur lequel on dispose un disque de papier filtre ; nous utilisions à l'origine un tampon de laine de verre au lieu de diaphragme en verre fritté ; l'épaisseur de ce tampon (5mm) nuit à la séparation de couches très voisines : séparées à la base de la colonne silicique, ces fractions se remélangeaient au niveau de la laine de verre.

La partie inférieure ainsi préparée est immergée sous éther de pétrole en ayant soin de ne laisser aucune bulle d'air. Le gel de silice en suspension est ensuite ajouté par fractions de 10 ml ; les parois du tube sont rincées chaque fois par une petite quantité d'éther de pétrole ; chaque fraction est sédimentée sous pression d'azote en imprimant au tube un mouvement de rotation, le faisant rouler alternativement dans un sens et dans l'autre entre les deux mains tenues au-dessus de la suspension. Ces opérations ne sont toutefois pas suffisantes pour obtenir la densité recherchée du gel ; il faut, en plus, tasser chaque fraction à l'aide d'une baguette de verre élargie à la base en un plateau de diamètre légèrement inférieur à celui du tube.

Lorsque la totalité de la suspension a été placée dans le tube à chromatographie, une rondelle de papier filtre est déposée à la surface de la colonne et tassée avec la baguette de verre. Le départ doit être bien homogène et compact, sans bulles d'air : ces détails déterminent un départ en couches bien individualisées des différents éléments à analyser et à doser.

c) L'extrait éthéro-pétrolique réduit à un volume minimum, inférieur ou au plus égal à 1 ml est déposé à la surface de l'adsorbant ; le tube est alors mis sous pression d'azote jusqu'à ce que le ménisque affleure la surface. Le haut de la colonne est rincé deux fois avec 1 ml d'éther de pétrole et le ménisque du surnageant est finalement arrêté au niveau du gel de silice. Dès lors l'échantillon peut être soumis aux liquides d'élution.

d) Elution. La colonne à chromatographie est préparée à partir d'une suspension de silice hydratée dans l'éther de pétrole ; ce solvant représente pratiquement le solvant le moins polaire que l'on puisse utiliser. Les corps à séparer ont une structure chimique très voisine et, en fait, ne diffèrent entre eux que par des degrés d'oxydation très voisins et par leur isomérie. Nous avons recherché pour l'élution, en mélange avec l'éther de pétrole, des solvants polaires moyens ; le benzène, l'acétone, l'éthanol et l'éther éthylique ; ce dernier solvant a donné les résultats les plus intéressants. L'éther éthylique doit être exempt de peroxydes ; il est distillé et recueilli sur Chlorure stanneux et conservé en fla-

cons bruns à l'abri de la lumière.

Pratiquement, les solvants et mélanges suivants :

- éther de pétrole (fraction distillant entre 45 et 73°C)
- éther de pétrole - éther éthylique (90 - 10, 80 - 20 et 50 - 50)

conviennent bien pour les séparations que nous analyserons plus loin.

e) Résultats, caractérisations et dosages. Les caroténoïdes hydrocarbonés sont peu adsorbés et élués très facilement par l'éther de pétrole dans l'ordre suivant :

- polyènes incolores : phytoène (fluorescence bleu en U.V.) et
  phytofluène (fluorescence vert olive)
- carotènes
- poly-cis-lycopènes
- lycopènes

L'adjonction d'un solvant polaire, en l'occurence l'éther éthylique, à des doses de 2 à 5 %, est nécessaire pour entrainer les époxydes.

Enfin une concentration plus importante en éther éthylique (10 à 50 %) permettra d'éluer les dérivés hydroxylés, les xanthophylles.

Les caroténoïdes sont caractérisés par leur spectre d'absorption dans l'hexane et, en cas de doute, dans d'autres solvants (chloroforme, benzène). (Karrer et Jucker - Goodwin).

Les dosages sont également réalisés par spectrophotométrie, tout au moins en ce qui concerne les composés à absorption maximale dans les longueurs d'onde supérieures à 4.250 A, ce qui n'élimine, en fait, que les polyènes fluorescents (phytoène, phytofluène et phytofluénol) ; ces composés n'ont donc pas été dosés d'une façon absolue mais leurs concentrations ont été comparées à l'aide d'un fluorescimètre ; à titre d'exemple nous avons pris, pour juger des concentrations relatives de phytoène dans différentes cultures de tissus de Topinambour, un extrait de tubercule de Topinambour pris pour 100 et nous avons comparé la fluorescence des autres extraits en utilisant les filtres suivants :

- filtre primaire B Hg 1,365 mμ
- filtre secondaire (bleu vert) B 470

Le spectre et les coefficients d'adsorption de ces polyènes incolores sont cependant bien connus (Phytoène : maxima à 275, 285, 296 mμ dans l'hexane ; Phytofluène : 332, 348, 368 mμ dans le même solvant) ; mais notre méthode de séparation ne nous permet pas d'utiliser ces caractéristiques pour leur dosage : pour les longueurs d'onde inférieures à 3.900 A une absorption parasite se surajoute à celle des composés étudiés, absorption parasite dûe en grande partie à la fluorescence propre à ces substances.

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX.

A - ESSAIS PRELIMINAIRES.

Des essais préliminaires ont été faits sur diverses graines trempées durant 24 heures dans des solutions de chlorhydrate de Tétracycline à des concentrations variables de 1,10, 20, 100, 200 μ g/ml, puis germant en cristallisoir sur coton hydrophile-papier filtre imbibé d'eau du robinet. Les échantillons sont prélevés le 8ème jour, les tiges mesurées et les pigments chlorophylliens dosés globalement par colorimétrie.

Les résultats sont résumés par le tableau suivant groupant les taux de chlorophylles et une expression de la croissance, ce terme de croissance étant utilisé sous restriction puisqu'il n'est défini que par la mesure des seules parties aériennes, chlorophylliennes.

Valerianella olitoria Mœnch. :

- 200 et 100 μg/ml : croissance 25 %
  chlorophylles 10 %
- 20 μg/ml : croissance 57 %
  chlorophylles 60 %

Lactuca sativa L. var. "Belle de Mai" :

- 200 et 100 μg/ml : croissance à peu près identique au témoin.
  chlor: 80 et 87 %
- 20 μg/ml : pas d'action

Cynara Cardunculus L. :

- 200 μg/ml : ralentissement de la croissance des racines seulement
  chlor: 94 % ; pas ou très peu d'action

Allium Porrum L. :

- 100 μg/ml : croissance 22 %
  chlor: 16 %
- 20 μg/ml : croissance 63 %
  chlor: 44 %

Brassica campestris L. var. oleifera :

- 200, 100 et 50 μg/ml : croissance peu ralentie: 68 à 97 %
  chlorophyllogénèse inhibée: 12 à 74 %
- 10 et 1 μg/ml : croissance et taux de chlorophylles à peu près identiques au témoin

Ervum Lens L. var. verte du Puy :
action inhibitrice sur la croissance et sur la chlorophyllogénèse jusqu'à 1 μg/ml

Raphanus sativus L. :

- faible ralentissement de la croissance à la dose limite de 100 μg/ml (87 % de croissance) ; par contre nette action sur les pigments chlorophylliens jusqu'à 1 μg/ml, s'accompagnant d'un accroissement de la formation des pigments anthocyaniques.

Ces expériences préliminaires montrent qu'il n'existe pas de parallélisme entre les divers phénomènes toxiques dûs à l'antibiotique ; par exemple, le Colza a une croissance identique au témoin, mais présente des troubles, se traduisant pas une seule chlorose. Chez le Poireau, croissance et chlorophyllogénèsesont fortement diminuée. Il y a une discordance dans les phénomènes engendrés par l'antibiotique, qui doit être attribuée à une sensibilité différente des espèces végétales vis-à-vis de celui-ci ; ainsi se posait le choix du matériel végétal. L'inhibition de la chlorophyllogénèse fût, avec la croissance, l'un de nos premiers critères et qui nous fit choisir le Radis ; l'étude d'autres métabolismes devait, par la suite, faire adjoindre à ce matériel d'autres espèces ; quoi qu'il en soit, cette raison fait que nous avons utilisé le Radis, de préférence, pour un certain nombre d'expériences.

B - ACTION DE LA TETRACYCLINE APPLIQUEE SUR LE RADIS AU STADE "GRAINE".

L'action de l'antibiotique sur une graine est fonction non seulement de sa concentration, mais également du temps de contact entre celui-ci et celle-là. Les téguments et les tissus qui isolent l'embryon du milieu extérieur peuvent représenter des obstacles à l'activité de l'antibiotique, obstacles que l'on pourrait mettre en avant pour expliquer les différences de sensibilité des diverses espèces expérimentées. Il convenait donc d'étudier le passage de l'antibiotique à travers ceux-ci.

La nature des téguments et des tissus de réserve déterminent la vitesse et la possibilité de passage de l'antibiotique jusqu'à l'embryon. Nous avons recherché le temps minimum d'immersion de la graine dans une solution de titre donné de telle sorte que l'activité antichlorophyllienne manifeste un effet maximum. Nous prendrons, comme type d'expériences, celles qui furent faites sur le Radis, les autres étant calquées sur celles-ci.

1 - Temps d'imbibition.

Des graines de Radis sont trempées dans une solution de chlorhydrate de Tétracycline à la concentration de 100 µg/ml. Ces graines sont lavées convenablement à l'eau du robinet puis placées sur coton-papier filtre mouillé, au bout des temps suivants :

5, 10, 15, 20, 30 minutes, 2, 4, 9, 24 et 48 heures.

Les graines germent et se développent dans les conditions que nous avons jusqu'alors adoptées ; lumière : 2 fois 6 heures sur 24, température 22°C. Les dosages de pigments chlorophylliens sont faits le 8ème jour. Les dosages sont réalisés sur la partie aérienne de la plantule. Les résultats sont indiqués par rapport au témoin auquel nous avons attribué la valeur 100.

Résultats :

Temps d'immersion des graines	5'	10'	15'	20'	25'	30'	2h	4h	9h	24h	48h
Pigments chlorophylliens	97	102	95	81	58	39	23	16	16	14	13

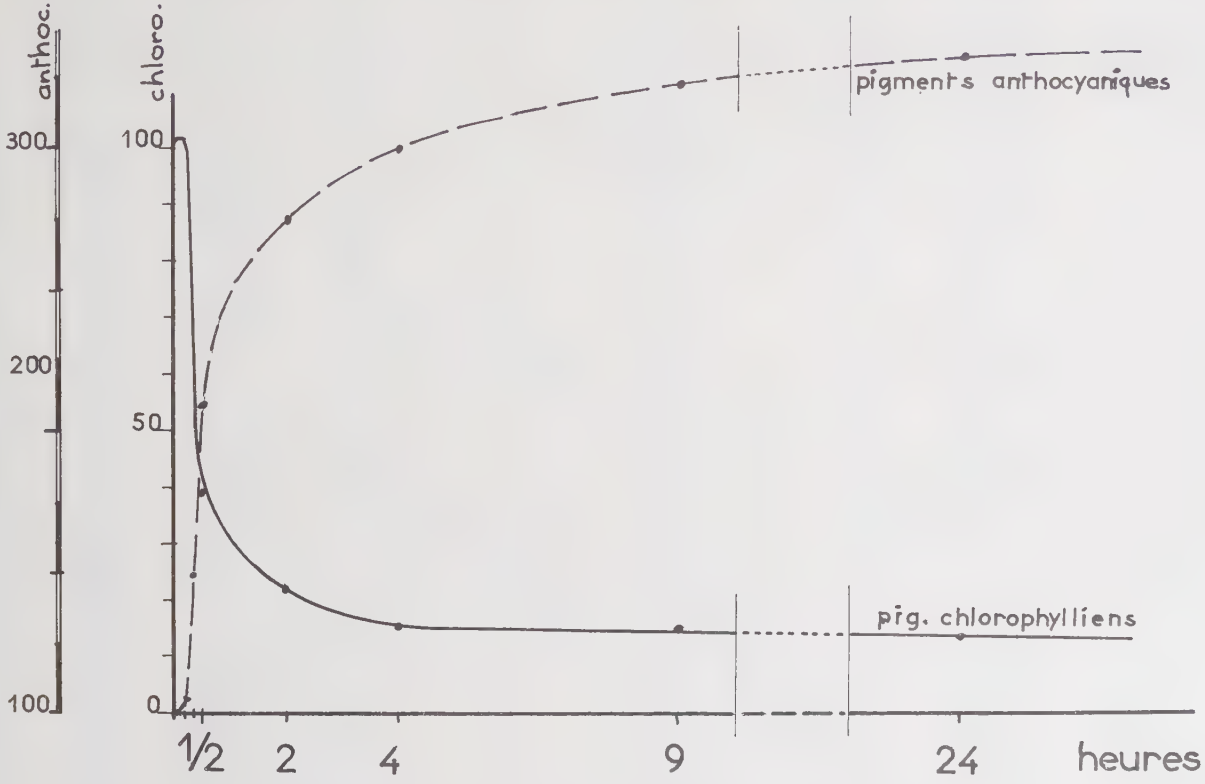
Dans cette même expérience nous avions également dosé les pigments anthocyaniques ; cependant, afin de faciliter l'exposition graphique, nous avons représenter sur le même tableau les variations des deux courbes, pigments acétonosolubles et pigments anthocyaniques, mais avec deux échelles différentes (fig. 12).

Extraction des pigments anthocyaniques : L'extraction est faite sur la partie aérienne de la plantule, broyée au mortier puis épuisée par l'acide chlorhydrique N/1.

Les liquides d'extraction sont filtrés sur verre fritté puis ajustés à une concentration comparable.

Le dosage est fait globalement à l'électrophotomètre de Meunier écran 52. Les résultats sont indiqués par rapport au témoin ; nous avons attribué au taux d'anthocyanes contenus dans le témoin la valeur 100, de la même façon que pour les pigments acétonosolubles.

Les pourcentages de chlorophylles correspondent à des prises d'essais identiques, des différents échantillons.



Courbes de variation des pigments en fonction du temps d'imbibition de la graine dans une solution de Tétracycline (HCl) à 100µg ml .

Fig. 12

A cette dilution, l'antibiotique n'agit pas sur la croissance d'une façon importante ; des mesures faites sur 150 plantules montrent que la croissance des plantules traitées varie entre 80 et 85 % de celle des témoins et ceci dans les conditions les plus défavorables, c'est à dire lorsque les graines sont traitées pendant 24 heures par la solution antibiotique à 100 μg/ml. Cette inhibition n'est pas suffisante pour que nous ne puissions pas considérer comme étant au même stade végétatif les plantules traitées par rapport au témoin, au moment du dosage des pigments.

La représentation graphique nous montre que l'antibiotique diffuse facilement à travers les téguments de la graine et qu'il manifeste très rapidement son activité : une demi-heure d'immersion dans la solution à 100 μg/ml provoque une diminution des pigments acétono-solubles de plus de moitié. Mais la conclusion représentant l'intérêt le plus pratique est qu'une immersion de la graine dans la solution de l'antibiotique pendant un temps d'au moins 4 heures permettra à celui-ci de développer son action maximum.

Des expériences identiques à celle-ci faites sur le Blé, le Pois, la Lentille, nous ont montré qu' une durée d'immersion des graines pendant 6 heures au maximum, était largement suffisante pour que l'antibiotique manifeste son activité maximum. En fait, nous avons dans la suite de ce travail, fait agir les solutions de Tétracyclines pendant une nuit pratiquement, c'est à dire pendant une durée de 12 à 14 heures.

Les pigments anthocyaniques suivent une variation inverse à celle des pigments acétonosolubles. L'action de l'antibiotique se manifeste rapidement : en une demi-heure le taux d'anthocyanes formés est double de celui du témoin.

2 - Action de l'antibiotique à diverses concentrations.

Les graines sont trempées pendant une nuit dans des solutions de Tétracyclines (HCl) aux concentrations respectives de 100, 10, 1 et 0,1 μg/ml, puis germent et croissent dans les mêmes conditions que précédemment. Le dosage global des pigments chlorophylliens au 8ème jour donne les pourcentages suivants :

Témoin :	100
0,1 μg/ml :	97
1 - id - :	73
10 - id - :	26
100 - id - :	12

Les résultats ont été reportés sous forme de graphique. Pour les commodités de représentation, nous avons exprimé, comme précédemment, les variations des différents pigments (chlorophylliens et anthocyaniques) suivant deux échelles distinctes. (fig. 13)

Ces résultats montrent que la synthèse des chlorophylles est influencée par des doses faibles d'antibiotiques (75 % seulement de pigments sous l'influence de 1 μg/ml de tétracycline) ; ceci est d'autant plus intéressant qu'à ces concentrations la croissance des plantules traitées, est exactement identique à celle des témoins.

D'autre part, si la Tétracycline manifeste une activité inhibitrice sur la formation des pigments chlorophylliens, elle favorise au contraire celle des anthocyanes. Ces actions se manifestent jusqu'à la dilution de 10^{-6}.

3 - Variation du taux des pigments pendant les premiers jours de croissance.

Des graines de Radis sont trempées pendant 14 heures dans l'eau ordinaire d'une part, dans une solution de Tétracycline à 100 μg/ml d'autre part. Les graines sont, après lavage, placées à raison de 25 dans des cristallisoirs sur coton imbibé d'eau du robinet. Poids frais des tiges et dosages des pigments sont faits sur 50 plantules les 4ème, 6ème, 7ème et 8ème jours. Les pigments chlorophylliens sont dosés par rapport à une solution acétonique de chlorophylles extraites de plantules âgées de 8 jours.

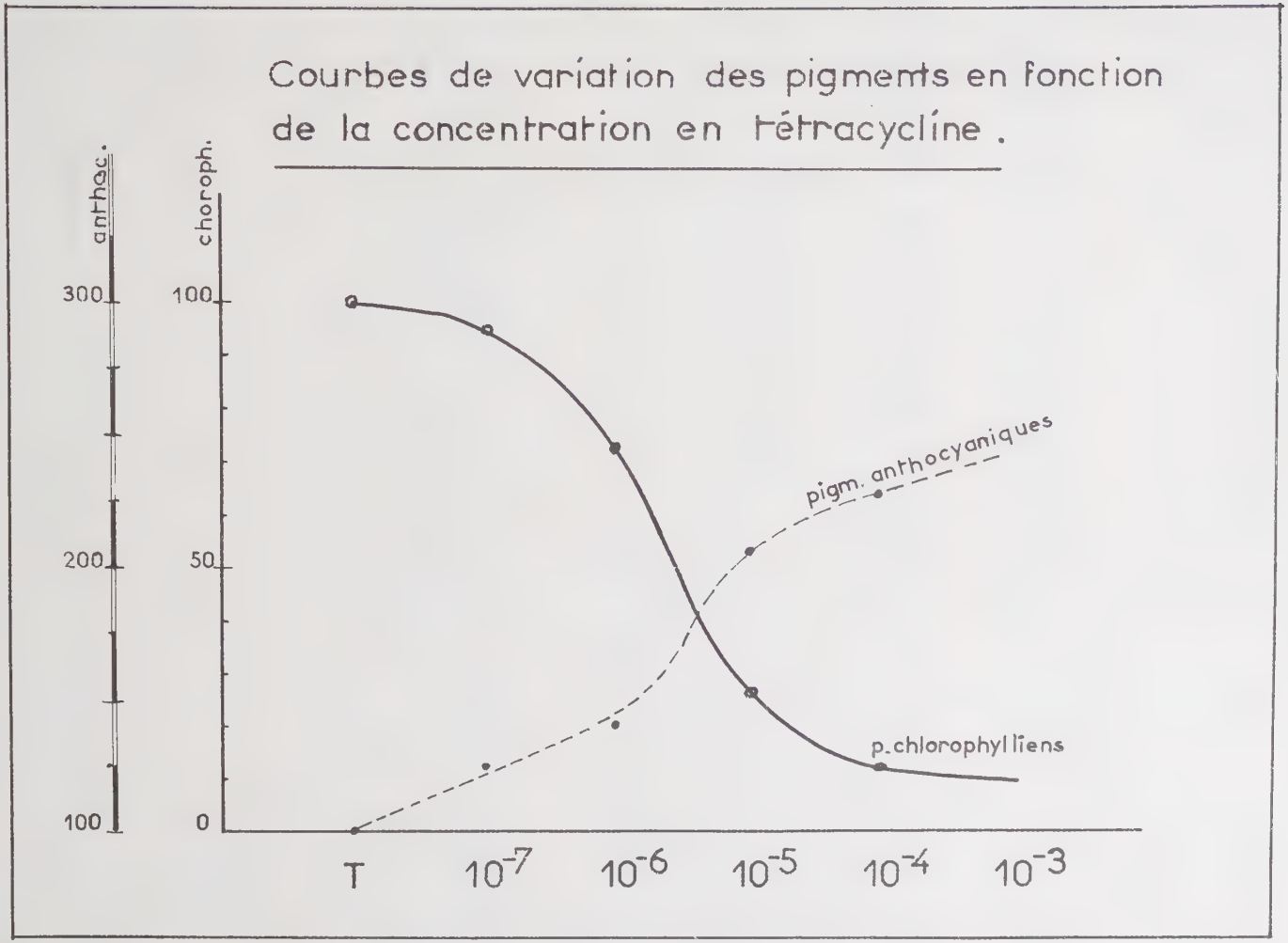

Courbes de variation des pigments en fonction de la concentration en tétracycline.
anthoc.
choroph.
300
200
100
100
50
0
pigm. anthocyaniques
p. chlorophylliens
T
10^{-7}
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}

Fig. 13

Nous avons attribué la valeur 100 au taux de pigments contenus dans les plantules témoins au 8ème jour.

Jours	Poids frais (en g)		Pigments acétonosolubles	
	T	100 µg/ml	T	100 µg/ml
4ème	1,723	1,471	200	14
6ème	3,555	2,150	160	10
7ème	4,035	3,085	110	8
8ème	4,110	3,590	100	8

Au cours de la croissance, les pigments acétonosolubles semblent subir une diminution qui n'est en réalité qu'apparente, les pigments étant contenus en plus grande partie dans les deux feuilles cotylédonaires qui se développent moins rapidement que la tige ; par conséquent, la quantité de chlorophylles rapportée au poids de la partie aérienne de la plantule est, en apparence, plus importante dès les premiers jours de croissance.

Ces résultats montrent que, sous l'action de l'antibiotique, les pigments chlorophylliens sont fortement diminués dès le début de la croissance et d'une façon irréversible pendant le temps de l'expérience ; la quantité de chlorophylles des plantules traitées ne dépasse jamais 10 % de celle des témoins.

C - ACTION DE LA TETRACYCLINE SUR LA PLANTULE (STADE DEUX FEUILLES COTYLEDONAIRES)

Dans ces expériences, l'antibiotique est mis en contact avec le seul système radiculaire des plantules de Radis.

Des lots identiques de plantules croissant à l'obscurité, à température de 22°C, âgées de 2, 3, 4 et 5 jours sont placés en cristallisoirs sur coton imbibé respectivement de solution de Tétracycline à 500 µg/ml et 100 µg/ml. Dès ce moment l'expérience est conduite en chambre de culture dans les conditions ordinaires ; l'expérience est arrêtée au 8ème jour et les pigments acétonosolubles sont dosés par rapport aux témoins du jour de traitement auxquels on accordera la valeur 100.

Plantules traitées le :	500 g/ml	100 g/ml	Témoin
2ème jour	10	10	100
3ème jour	35	63	-id-
4ème jour	47	69	-id-
5ème jour	49	75	-id-

Ainsi, la plantule est d'autant plus sensible à l'antibiotique qu'elle est plus jeune ; l'activité de la Tétracycline diminue très rapidement avec l'âge de la plantule. Un traitement qu 4ème ou 5ème jour ne provoque une chute du taux des pigments chlorophylliens qui n'est apparente que par titrage. Il faut cependant noter que de fortes doses (500 µg/ml) peuvent encore au 5ème jour diminuer de 50 % la formation des pigments.

D - ACTION DE LA TETRACYCLINE SUR DES PLANTULES DE POLYGONUM FAGOPYRUM L., BRASSICA NIGRA KOCH. ET PHASEOLUS VULGARIS L. cultivées en serre, sur terre ou sur sable.

Dans ces séries d'expériences nous avons recherché, d'une part les variations du taux des pigments chlorophylliens dans des feuilles insérées à différents niveaux, mais à un même stade végétatif des plantules témoins et traitées (Sarrasin et Moutarde), et d'autre part ces variations en fonction du temps dans des lots de feuilles de même niveau (Haricot).

1 - SARRASIN ET MOUTARDE -

Protocole expérimental : Les graines de ces deux espèces sont placées dans des pots remplis, les uns de sable de Fontainebleau, les autres d'un mélange à parties égales de terre végétale et d'humus. La culture est faite en serre aérée dans les conditions naturelles de température et d'éclairement des mois de juin et juillet. Tous les pots sont arrosés, dès le deuxième jour, par des quantités égales, soit d'eau ordinaire (Témoin "Terre"), soit de solution nutritive (Knop au 1/2 pour Témoin "Sable"), soit de solution de Tétracycline à 100 μg/ml dans l'eau ordinaire ou dans la solution nutritive (Traitée), et ceci une fois par jour.

Les prélèvements de feuilles ont lieu lorsque les plantules ont atteint le stade 4 feuilles pour le sarrasin, 7 feuilles pour les plantules de Moutarde ; les feuilles cotylédonaires ne sont pas prélevées ; le développement des plants, témoins et traités, est visuellement identique ; nous n'observons pas de retard dans l'apparition successive des feuilles chez les différents lots.

Les prélèvements sont faits sur 10 plants et les lots de 10 feuilles sont numérotés de 1 à 4 ou de 1 à 7 suivant l'espèce expérimentée, les numéros 1 correspondant aux feuilles les premières formées, c'est à dire les plus anciennes et les numéros 4 ou 7 aux plus jeunes.

Les feuilles prélevées sont aussitôt placées en gros tubes ou en flacons à large ouverture bouchés renfermant un peu de coton hydrophile imbibé d'eau de façon à créer dans le récipient une atmosphère saturée de vapeur d'eau afin d'éviter une dessication des échantillons avant leur pesée au laboratoire.

L'emploi de deux supports de culture, sable et terre, nous a été dicté par l'idée de comparaison suivante : la molécule de Tétracycline possède un certain nombre de groupements polaires permettant une adsoption assez facile sur différents adsorbants et une capacité d'échange avec les ions Hydrogène, Sodium ou Potassium ; les colloïdes du sol peuvent, à priori, jouer un rôle d'adsorbant et bloquer de ce fait, en tout ou partie, l'activité de l'antibiotique. L'emploi de deux sols pourrait donner une réponse à cette hypothèse.

Les chlorophylles sont dosées spectrophotométriquement suivant la méthode de Comar et Zscheile.

Résultats : Dans les tableaux les poids frais correspondent à celui de 10 feuilles. Les quantités de chlorophylles a, b et totale sont exprimées en mg pour 100 g de poids frais.

L'antibiotique, désigné par la lettre S(= S anclomycine), est utilisé en solution à la dose de 100 μg/ml.

SARRASIN cultivé sur TERRE					
		1ère feuille	2ème feuille	3ème feuille	4ème feuille
Poids frais	T	4, 965	4, 790	3, 340	1, 090
	S	2, 885	2, 560	1, 715	0, 580
Chlor. a	T	91	82	105	100
	S	74	93	112	40
Chlor. b	T	32	27	35	45
	S	25	31	33	26
Chlor. totale	T	123	109	140	146
	S	99	123	145	66
Rapport $\frac{b}{a}$	T	0, 35	0, 33	0, 33	0, 44
	S	0, 34	0, 33	0, 29	0, 65

SARRASIN cultivé sur SABLE (arrosé de milieu nutritif)					
		1ère feuille	2ème feuille	3ème feuille	4ème feuille
Poids frais	T	4, 535	4, 115	2, 970	0, 925
	S	3, 530	4, 330	3, 600	1, 440
Chlor. a	T	75	82	110	112
	S	73	80	84	72
Chlor. b	T	30	30	42	47
	S	27	29	32	31
Chlor. totale	T	105	113	152	160
	S	100	109	117	103
Rapport $\frac{b}{a}$	T	0, 40	0, 37	0, 38	0, 42
	S	0, 37	0, 36	0, 38	0, 43

MOUTARDE sur TERRE — Dans cette expérience une dose de 50 µg/ml a été utilisée en plus de celle de 100 µg/ml ; nous les définirons par S_{50} et S_{100}.

		1ère f.	3ème f.	5ème f.	6ème f.	7ème f.
Poids frais	T	2, 175	2, 035	2, 320	1, 265	0, 630
	S_{50}	1, 775	1, 845	1, 530	0, 750	0, 640
	S_{100}	2, 275	2, 025	1, 145	0, 570	0, 280
Chlor. a	T	64	106	119	121	102
	S_{50}	55	82	56	112	123
	S_{100}	61	81	99	108	99
Chlor. b	T	28	43	47	49	48
	S_{50}	21	29	21	46	47
	S_{100}	27	33	39	40	41
Chlor. totale	T	92	149	166	170	150
	S_{50}	76	111	77 (?)	158	170
	S_{100}	88	114	138	148	140
Rapport $\frac{b}{a}$	T	0, 43	0, 40	0, 39	0, 40	0, 47
	S_{50}	0, 38	0, 36	0, 37	0, 41	0, 38
	S_{100}	0, 44	0, 41	0, 39	0, 37	0, 41

MOUTARDE sur SABLE

		1ère f.	3ème f.	5ème f.	6ème f.	7ème f.
Poids frais	T	2, 480	2, 560	2, 335	1, 420	0, 690
	S_{100}	1, 775	2, 750	2, 235	1, 205	0, 485
Chlor. a	T	59	95	115	110	120
	S_{100}	54	69	94	114	92
Chlor. b	T	23, 5	39	44	44	56
	S_{100}	27	28	39	40	43
Chlor. totale	T	82, 5	134	159	155	176
	S_{100}	81	97	133	154	137
Rapport $\frac{b}{a}$	T	0, 40	0, 41	0, 38	0, 40	0, 47
	S_{100}	0, 50	0, 41	0, 41	0, 35	0, 47

Interprétation des résultats : Considérons d'abord les expériences "Sarrasin" ; si nous examinons le seul phénomène de la croissance, les plantules traitées et cultivées sur terre possèdent des feuilles moins développées que celles correspondantes du témoin ; les proportions de croissance en poids frais sont respectivement de :

n°1 : 58 %, n°2 : 53 %, n°3 : 51 %, n°4 : 53 %.

Par contre lorsque les plantules sont cultivées sur sable et arrosées de solution nutritive, les feuilles ne sont pas touchées dans leur développement et mieux, leurs formations paraissent stimulées, comme l'indiquent les pourcentages suivants :

n°1 : 78 %, n°2 : 106 %, n°3 : 120 %, n°4 : 152 %.

La comparaison des résultats de dosage des chlorophylles nous conduit à une conclusion exactement inverse, sauf en ce qui concerne les dernières feuilles, c'est-à-dire les plus jeunes ; les rapports des taux de chlorophylle totale par rapport à ceux des témoins correspondants sont respectivement :

- sur terre : n°1 : 80 %, n°2 : 112 %, n°3 : 103 % et n°4 : 45 %.
- sur sable : n°1 : 95 %, n°2 : 97 %, n°3 : 77 % et n°4 : 64 %.

Le rapport $\frac{\text{chlor. b}}{\text{chlor. a}}$ est, d'une façon générale, toujours plus élevé dans les cas de cultures sur sable que ceux de culture sur terre. Ces rapports sont identiques dans les premières feuilles témoins et traitées ; par contre dans les feuilles n°4, c'est à dire les plus jeunes, ce rapport est plus élevé pour les sujets traités que pour les témoins.

Expérience "Moutarde" : La croissance des feuilles se poursuit d'une façon assez semblable à celle de l'expérience précédente et fait conclure, à quelques nuances près, d'une façon identique. Dans le cas de cultures sur terre, les deux premières feuilles sont identiques au témoin ; par contre les dernières, subissent, sous l'action de l'antibiotique une inhibition de 50, 55 et 56 %. Il semble que, par rapport à l'espèce précédente le seuil d'action de l'antibiotique soit, ici plus élevé puisqu'un plus grand nombre d'arrosages avec la solution de Tétracycline sont nécessaires pour faire apparaître les premiers troubles (à partir de la 5ème feuille). On peut également dire que la Moutarde est une espèce moins sensible que le Sarrasin vis-à-vis des Tétracyclines.

Les feuilles des plantules, cultivées sur sable, sont également inhibées dans leur croissance par les solutions antibiotiques mais bien moins que dans le cas des cultures sur terre (15 et 30 % d'inhibition maximum).

Les quantités de chlorophylles totales sont plus faibles dans les feuilles traitées et ceci dans les deux types d'expérience, mais les diminutions sont plus importantes dans l'expérience "sable" que dans l'autre. Le ralentissement de la chlorophyllogénèse est toutefois bien moins importante que celui que nous avons constaté chez le Sarrasin.

Le comportement de culture sur les deux milieux et le traitement ou non par la solution antibiotique n'apportent aucun changement sensible au rapport $\frac{\text{chlor. b}}{\text{chlor. a}}$ qui reste voisin de 0,40 chez les feuilles adultes et atteint 0,47 chez les feuilles en formation (7èmes feuilles).

L'examen de ces résultats laisse apparaître des différences de comportement, au moins quantitativement, entre les deux espèces ; mais, ceci mis à part, des conclusions plus générales peuvent être tirées de ces expériences (fig. 14 et 15).

- Que ce soit sur la croissance ou sur la chlorophyllogénèse, l'action de l'antibiotique la plus nette se manifeste sur la feuille la plus jeune, la dernière formée. La vitesse de développement des plantules, le moment d'apparition des différentes feuilles sont identiques pour les plants témoins et traités ; nous n'avons pas observé de troubles dans la morphogénèse. Il faut cependant souligner que les doses d'antibiotique(80 à 100 ml de solution à 100 μg/ml par jour) représentent finalement par accumulation des doses massives, qui n'ont, en définitive que peu d'action sur les feuilles morphologiquement différenciées.

Sarrasin

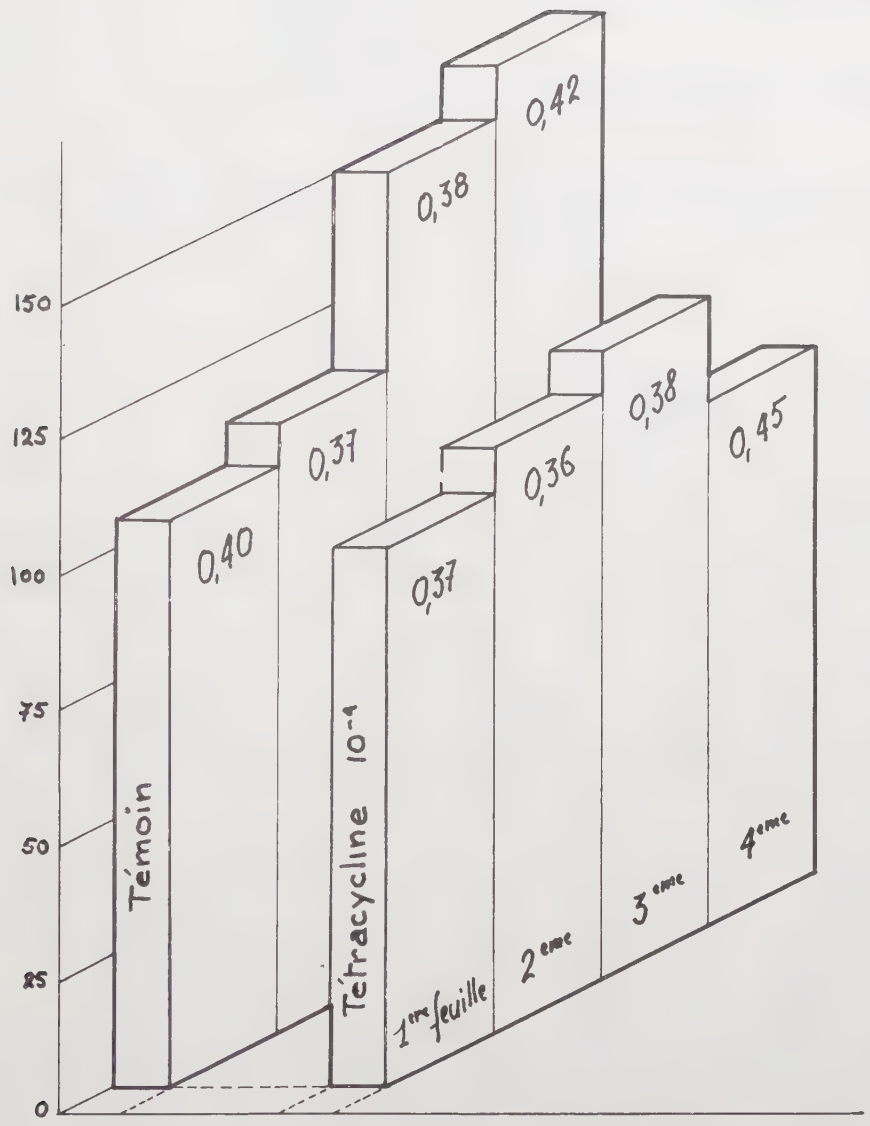


Fig. 14 - Sarrasin cultivé sur sable.
Quantités de chlorophylles totales en mg, contenues dans 100 g. de feuilles fraîches de différents niveaux, et rapports : chlorophylle b / chlorophylle a.

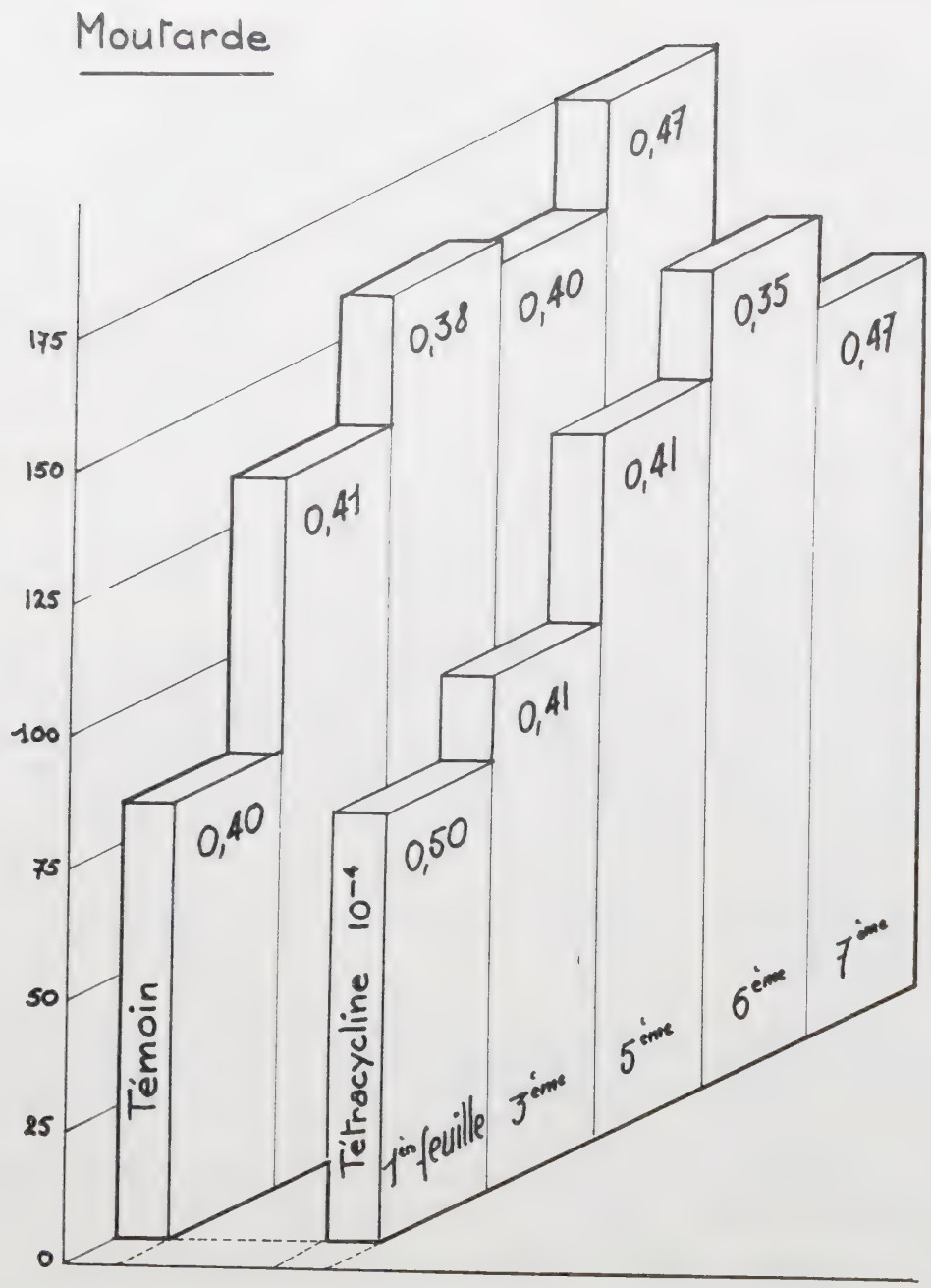


Fig. 15 - Moutarde cultivée sur sable.
Quantités de chlorophylles totales en mg, contenues dans 100 g. de feuilles fraîches de différents niveaux, et rapports : chlorophylle b / chlorophylle a.

- Inhibition de croissance et inhibition dans la formation des pigments chlorophylliens ne semblent pas être des phénomènes directement dépendants ; on observe, en effet, suivant le mode d'expérience soit une diminution du poids des feuilles, soit une chlorose, et les rapports entre ces troubles apparaissent sans proportionalité lorsqu'ils ne sont pas exactement inverses.

- D'un point de vue général, et en dehors de toute recherche sur l'activité des Tétracyclines, il faut remarquer que si le rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ est relativement constant pour les feuilles adultes, ce rapport est supérieur à cette constante dans les dernières feuilles apparues, en voie d'épanouissement, c'est à dire dans les feuilles où l'anabolisme est le plus intense ; par exemple :

moutarde sur terre : b/a ≠	0,41	0,47 dans la dernière feuille
moutarde sur sable : b/a ≠	0,40	0,47 -id-
sarrasin sur terre : b/a ≠	0,33/0,35	0,44 -id-
sarrasin sur sable : b/a ≠	0,39	0,42 -id-

La quantité de chlorophylle b est proportionnellement plus importante à ces niveaux de synthèse active.

- Le choix du sol ou plus exactement du support de culture représente un problème délicat. Dans l'exposé du protocole expérimental, nous expliquions le choix de deux supports, pensant au rôle éventuel des colloïdes du sol. Or, les résultats vont à l'encontre de l'hypothèse que nous avions tout d'abord formulée. Considérant la croissance des feuilles, nous avons montré que les plantules se développant sur terre étaient plus affectées que celles qui poussaient sur sable arrosé de solution nutritive .

L'action de l'antibiotique n'est donc pas annulée par un rôle éventuel des colloïdes du sol.

Si l'on prend ce même critère (croissance des feuilles), le choix du sable comme support de culture parait mal indiqué puisque l'antibiotique ne semble pas développer, dans ces conditions, une activité importante ; par contre, ce choix est intéressant pour l'étude des troubles manifestés sur la chlorophyllogénèse.

Quelle est la raison de cette différence de comportement des plantules expérimentées ? Nous ne saurions répondre à celà que par des hypothèses et non par des faits probants. Ces expériences mettent cependant en évidence la nécessité d'éviter les facteurs inconnus tels que ceux apportés par l'humus et la terre végétale et de bien définir les conditions expérimentales.

2 - HARICOT : CINETIQUE D'APPARITION DES CHLOROPHYLLES.

Protocole expérimental : Les conditions d'expérience sont sensiblement les mêmes que les précédentes : graines ensemencées en pots sur sable de Fontainebleau, maintenues en serre, arrosées de solution nutritive tous les jours ; le traitement par des solutions de Tétracyclines à 100 et 500 μg/ml dans la solution de Knop au 1/2 est commencé dès le 2ème jour.

Les prélèvements de feuilles sont faits sur 10 plantules, les 7ème, 9ème, 11ème et 14ème jours, mais seules sont prélevées les premières feuilles apparues.

Résultats : Les chlorophylles sont dosées suivant Comar et Zscheile ; les résultats en seront exprimés en mg pour 100 g de poids frais ou en mg pour 10 feuilles suivant les tableaux:

Les carotènes sont dosés globalement par spectrophotométrie après avoir été isolés selon une technique proposée par Costes et Coïc. Les carotènes sont extraits de la solution acétonique traitée pendant une nuit par une solution de potasse dans le méthanol. L'extraction est faite par un mélange à parties égales d'éther de pétrole et d'éther éthylique. L'extrait éthéré est concentré puis passé sur colonne d'un mélange en quantités égales de Carbonate de Calcium et de Célite. Les carotènes sont élués globalement par le mélange : éther de pétrole - éther éthylique - (2 vol - 1 vol) ; l'éluat est concentré à sec et les carotènes, repris par un volume déterminé d'hexane (10 ml) sont dosés au spectrophotomè-

tre dans la longueur d'onde de 451 mμ ; dans cette longueur d'onde et avec l'hexane comme solvant le coefficient d'absorption est :

$$E^{1\%}_{1cm} = 2.560$$

Les quantités de carotènes seront exprimées en mg/100 g de poids frais, ou en mg/10 feuilles.

Les poids frais sont exprimés en grammes. Les prélèvements de feuilles sont réalisés comme précédemment indiqués afin d'éviter une dessication partielle des échantillons lors de leur transport du jardin botanique au laboratoire.

Quantité absolue de chlorophylles et de carotènes dans 10 feuilles.					
		7ème jour	9ème jour	11ème jour	14ème jour
Poids frais (10 feuilles)	T	3, 205	4, 010	6, 260	7, 610
	S_{100}	1, 855	2, 570	3;350	5, 340
	S_{500}	1, 150	1, 575	2, 435	2, 170
Chlor. totale	T	2, 88	4, 20	6, 10	8, 30
	S_{100}	0, 84	1, 55	1, 79	3, 27
	S_{500}	0, 21	0, 15	0, 44	0, 31
Carotènes	T	0, 70	0, 31	1, 20	2, 12
	S_{100}	0, 32	0, 17	0, 36	0, 80
	S_{500}	0, 09	0, 03	0, 08	0, 12
Quantité de chlorophylles et carotènes pour 100 g de tissus frais.					
		7ème jour	9ème jour	11ème jour	14ème jour
Chlor. a	T	58	69	69	75
	S_{100}	32	40, 5	36	43
	S_{500}	12, 6	6, 4	12, 5	9, 2
Chlor. b	T	32	35	39	33, 5
	S_{100}	14	20, 5	18	19, 5
	S_{500}	5, 3	2, 9	5, 5	5
Chlor. totale	T	90	105	108	108
	S_{100}	46	61	54	62
	S_{500}	18	9, 3	18	14
Carotènes	T	21	8	19, 2	27, 6
	S_{100}	17, 3	6, 3	10, 8	15, 2
	S_{500}	7, 9	1, 4	3, 3	5, 4
Rapport $\frac{b}{a}$	T	0, 55	0, 51	0, 56	0, 45
	S_{100}	0, 44	0, 50	0, 50	0, 45
	S_{500}	0, 42	0, 45	0, 44	0, 54

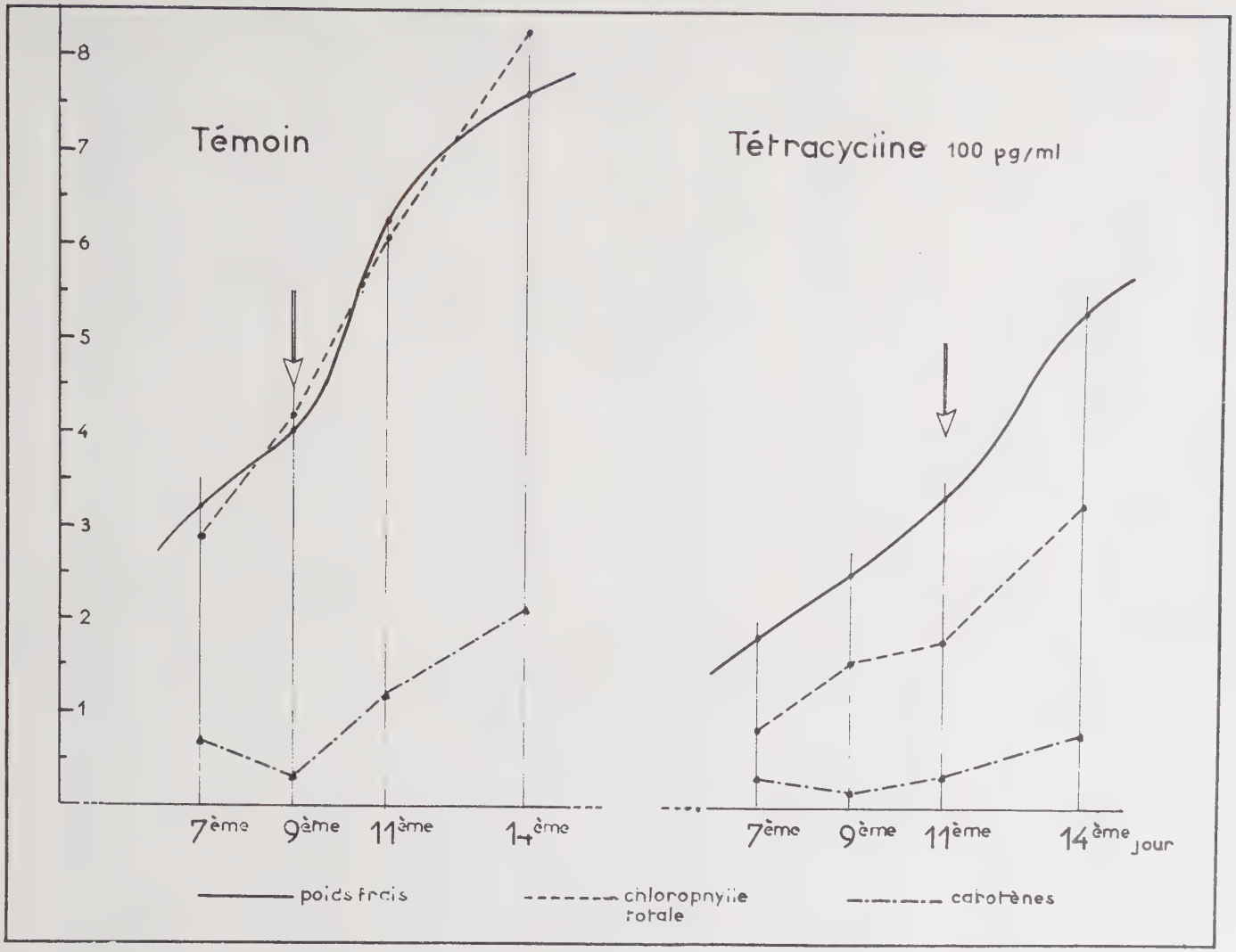


Fig. 16 - Variation des poids frais et des teneurs en pigments liposolubles au cours du développement des premières feuilles de Phaseo lus Vulgaris L.

L'antibiotique provoque également un ralentissement dans le développement de la plantule ; les deuxièmes feuilles apparaissent au 9ème jour chez les témoins et au 11ème chez les plantules traitées à 100 μg/ml ; le traitement par une solution à 500 μg/ml ne présente pas un grand intérêt car trop toxique : au bout de 14 jours les deuxièmes feuilles ne sont encore pas apparues.

Interprétation des résultats : Les quantités de chlorophylle totale, pour 100 g de tissus frais, sont à peu près identiques à celle que l'on a trouvées dans les feuilles de Sarrasin et de Moutarde ; chez le Haricot, le rapport $\frac{b}{a}$ est toutefois plus élevé que dans les espèces précédentes.

Sous l'influence de l'antibiotique, les plantules subissent un retard de développement : les 2èmes feuilles apparaissent au 9ème jour sur les plants témoins, au 11ème seulement sur les Haricots traités ; la croissance des feuilles est fortement ralentie. (58, 64, 54, et 70 % par rapport à T)

Sur la chlorophyllogénèse et la formation des carotènes, l'activité de l'antibiotique est encore plus importante (51, 58, 50 et 57 % de chlorophylles par rapport au témoin).

Les variations du rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ sont intéressantes à suivre en fonction des courbes de croissance des feuilles et de leur teneur en pigments acétono-solubles. Les trois courbes (croissance, chlorophylles et carotènes) ont été dressées sur le même graphique (fig. 16), les poids frais rapportés à l'échelle en grammes, les quantités de pigments en milligrammes. Les flèches marquent le moment d'apparition des deuxièmes feuilles.

L'examen de ces courbes montre que la croissance n'est pas régulière, le développement des feuilles témoins est rapide au 7ème jour, ralentit au 9ème, accélère de nouveau jusqu'au 11ème jour ; puis au 14ème et les jours suivants l'augmentation de poids est de plus en plus faible : les feuilles ont atteint leur stade adulte. Il faut remarquer que le fléchissement dans les courbes, de croissance et également de formation des pigments, correspond au moment d'apparition et de développement des feuilles immédiatement supérieures.

Autre constatation, le rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ est élevé dans les périodes de croissance rapide, puis diminue lorsque celle-ci ralentit et cesse au moment où la feuille a atteint son état adulte. Nous arrivons à la même conclusion que dans les paragraphes précédents : le rapport $\frac{b}{a}$ est le plus élevé lors des périodes actives de synthèse.

E - ACTION DE LA TETRACYCLINE SUR DES PLANTULES DE POIS DEVELOPPEES AU LABORATOIRE ET SUR DES CULTURES DE TISSUS DE CAROTTE ET DE TOPINAMBOUR CULTIVEES "IN VITRO".

Dans ces séries d'expériences, nous avons essayé de suivre le sort des pigments chlorophylliens et caroténoïdes au cours de la croissance de tissus cultivés *"in vitro"*. Les techniques expérimentales sont les mêmes que celles que nous avons indiquées jusqu'alors : dans chacun des paragraphes nous les rappellerons très brièvement nous réservant de développer certains détails pouvant offrir un intérêt particulier.

1 - PISUM SATIVUM L. VARIETE EXPRESS ALASKA.

Les graines sont trempées dans l'eau ordinaire et dans une solution de chlorhydrate de Tétracycline à 30 μg/ml, ensemencées sur coton-papier filtre ; des prélèvements sont faits en différents moments de l'évolution de la plantule ; les cotylédons sont séparés de la plantule et les analyses et dosages des pigments sont réalisés sur chacune des parties isolées. Les quantités de chlorophylles et de caroténoïdes seront exprimés en milligrammes pour 100 grammes de substances sèches. Les chlorophylles sont dosées suivant la méthode de Comar et Zscheile, les caroténoïdes après séparation sur gel de silice.

	0 h.	41 h.		113 h. (5 j.)		161 h. (7 j.)		192 h. (8 j.)		209 h. (9 j.)	
	Graine	Pl.	Cot.	Pl.	Cot.	Pl.	Cot.	Pl.	Cot.	Pl.	Cot.
Chlor. a T	5, 02	-	3, 20	38, 7	1, 05	62	1, 10	154	1, 73	231	2, 50
Chlor. a S		-	3, 05	5, 9	1, 42	7, 7	1, 96	7, 8	1, 32	36, 4	1, 65
Chlor. b T	3, 29	-	2	25	0, 38	20, 5	0, 92	54	1, 10	94	1, 54
Chlor. b S		-	1, 91	1, 8	1, 10	2, 4	1, 36	2, 45	0, 85	10, 5	1, 13
Chlor. totale T	8, 31	-	5, 20	63, 7	1, 43	83	2, 02	208	2, 84	325	4, 05
Chlor. totale S		-	4, 97	7, 7	2, 52	10, 1	3, 32	10, 2	2, 15	47	2, 78
Rapport $\frac{b}{a}$ T	0, 65	-	0, 62	0, 31	0, 65	0, 33	0, 83	0, 35	0, 63	0, 41	0, 62
Rapport $\frac{b}{a}$ S		-	0, 63	0, 305	0, 69	0, 31	0, 69	0, 305	0, 64	0, 31	0, 69

- (Les quantités sont exprimées en mg pour 100 grammes de substance sèche) -

PISUM SATIVUM - Pigments chlorophylliens des plantules et des cotylédons.

Après évaporation de l'extrait acétonique de la graine, les caroténoïdes sont repris par le mélange éther de pétrole - éther éthylique puis soumis à une séparation sur gel de silice ; l'élution est faite par 3 mélanges successifs, éther de pétrole redistillé (point d'ébullition 45° ⟶ 73°), puis éther de pétrole - éther éthylique à 2 et à 15 %. Chaque liquide d'élution entraîne certaines fractions ; nous les étudierons dans cet ordre.

1ère élution (éther de pétrole) : L'examen de la colonne après passage de 2 à 3 ml de solvant montre, à l'ultra-violet une bande jaune orangé (C) très bien séparée et migrant rapidement ; sous lampe de Wood deux bandes apparaissent à la base de la bande précédente,
l'une présentant une fluorescence bleue, très vive (A)
l'autre verdâtre (B)

L'analyse spectrophotométrique des polyènes incolores et fluorescents est difficilement réalisable en raison d'une absorption parasite que nous avons signalé dans les techniques générales ; il est cependant possible de détecter les zones d'absorption maximale lorsque ces composés sont en quantité suffisante, ce qui était le cas de la fraction présentant une fluorescence bleue ; par contre les intensités d'absorption ne peuvent pas être utilisées pour un dosage spectrophotométrique.

La première fraction, A, incolore, de fluorescence bleue présente les maximum d'absorption à 285, 285 et 296 mμ, Porter et Lscheile donnent pour ce composé en solution dans l'hexane des valeurs d'absorption maximale dans les longueurs d'onde de 275, 285 et 296 mμ . Les valeurs que nous avons trouvé ont été déterminées dans l'éther de pétrole, puis dans l'hexane ; en utilisant les deux solvants nous avons trouvé des chiffres identiques, nous n'avons pas trouvé d'explication à l'accroissement des différences dans les régions de longueur d'onde plus courte. Ceci mis à part, les caractéristiques d'absorption et la fluorescence de ce composé le caractérise comme étant le *Phytoène*.

La deuxième fraction, B, présente une fluorescence vert olive correspondant à un polyène également incolore, *le Phytofluène* ce composé se trouve en quantité trop faible pour que son spectre se dégage de l'absorption parasite encore très sensible en dessous de 400 mμ (le Phytofluène possède selon Koe et Zechmeister, des maximum d'absorption à 332, 348, 367,5 mμ).

Enfin la troisième fraction jaune orangé, C, présente les maximums suivants : point d'inflexion à 427,5 - 428,5, pics à 448 et 475 mμ ; dans l'hexane. En lumière ultra-violette, cette fraction n'est pas fluorescente. Les valeurs déterminées de cette fraction se trouvent comprises entre celles données par Goodwin :

α carotène	420 - 445 - 475 mμ
β carotène	425 - 451 - 482 mμ

En réalité il ne s'agit pas d'un seul pigment caroténoïde mais d'un mélange d'α et de β carotène ; une chromatographie sur papier de cette fraction concentrée donne deux taches presque au front du solvant. Nous avons pris pour doser cette fraction un coefficient d'absorption moyen, $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = à 451 m en solution dans l'hexane (Costes et Coïc).

2ème élution (éther de pétrole - éther éthylique 2 %) : cette élution entraîne 3 bandes E, F et G.

La fraction F est jaune pâle ; le spectre de ce composé dans l'hexane présente des pics dans les longueurs d'onde : 442 et 472 mμ . Ce corps correspond à l'α carotène 5 - 6 époxyde (Goodwin : 442 - 471 mμ) $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 2.400 à 442 mμ .

Les fractions E et G correspondent à une quantité trop faible de composés pour qu'il ait été possible d'en faire la détermination.

3ème élution (éther de pétrole - éther éthylique 15 %). Ce liquide d'élution permet de chasser de la colonne les composés hydroxylés, les xanthophylles. Une seule fraction (H) a été recueillie, de couleur jaune citrin et dont le spectre présente un point d'inflexion à 411,5 mμ et deux pics à 441 et 471 mμ Ce spectre correspond, selon Goodwin (443 - 472 mμ) à la *Violaxanthine* ; le dosage de ce composé par

spectrophotométrie a été fait en prenant pour coefficient d'extinction $E_{1\,cm}^{1\,\%}$ = 2 450 en solution dans l'hexane, à 441 mμ.

Ces mêmes composés ont été retrouvés au cours de l'analyse des extraits éthéro-pétroliques des cotylédons au 4ème et 8ème jour, la réunion des fractions F a permis d'avoir une quantité suffisante de caroténoïdes pour qu'il soit possible de déterminer les maximum d'absorption du spectre 62 : 442 mμ ; ces caractéristiques correspondent à celles que donne Goodwin pour le Flavochrome = 5 - 6 époxy-carotène (422 - 450 mμ).

D'autre part l'élution par le solvant à 15 % d'éther éthylique fait apparaître une deuxième tache de xanthophylle dans les cotylédons durant la croissance de la jeune plantule, fraction qui précède celle de la violaxanthine et absorbant au maximum les radiations de longueur d'onde 442 et 470 mμ ; ce composé serait l'Isolutéine = Lutéine 5 - 6 époxyde. (H) (Goodwin : 442 - 471 mμ).

Avant de résumer dans un tableau général les résultats d'analyse et de dosage, certains détails concernant les techniques utilisées méritent d'être développés. Ces remarques sont les suivantes :

1 - Les chlorophylles sont éliminées par hydrolyse dans la solution alcoolique ; cette opération risque d'altérer certains composés, ne serait-ce que d'hydrolyser les esters des xanthophylles. La saponification est nécessaire lorsque les quantités de chlorophylles sont relativement importantes mais elle peut être évitée lorsque le tissu n'en renferme qu'un peu. Les pigments chlorophylliens sont fixés à la colonne chromatographique par un mélange éthéré à 2 ou 10 % d'alcool éthylique. Avec le mélange à 10 % les chlorophylles migrent beaucoup plus vite que les xanthophylles.

2 - Les couleurs que nous avons données des différentes fractions sont celles que l'on décèle sur la colonne de silice et qui sont apparentes avec des quantités très faibles de caroténoïdes ; cette coloration n'apparaît plus lorsque le composé est élué, c'est à dire lorsqu'il est en solution à faible concentration. Il est ainsi possible de détecter un polyène à l'état de traces sans pouvoir le déterminer.

3 - La recherche des longueurs d'onde des rayons lumineux pour lesquels les absorptions sont maximum se fait la plupart du temps avec des solutions des caroténes dans l'hexane (tableau donné par Goodwin). Karrer et Jucker indiquent ces maximum pour des solutions dans l'éther de pétrole. Strain et ses collaborateurs ont montré que les valeurs n'étaient pas fixes avec des solvants mal définis tels que l'éther de pétrole ; c'est ainsi que le β carotène présente un maximum à 449 mμ lorsqu'il est mis en solution dans l'éther de pétrole à point d'ébullition 30 - 60°, et un maximum à 453 mμ pour le même solvant distillé entre 88 et 99°C ; nous avons utilisé la fraction d'éther de pétrole distillant entre 61 et 73°C et la plupart du temps les valeurs que nous avons obtenues étaient exactement les mêmes que celles déterminées avec une solution dans l'hexane.

Les mesures spectrophotométriques réalisées sur les fractions fraîchement collectées ont l'avantage d'éviter l'altération par oxydation des caroténoïdes, altérations qui ne manquent pas de survenir au cours des concentrations jusqu'à siccité puis reprise par de nouveaux solvants.

Résultats : Les quantités de caroténes seront exprimées dans les tableaux suivants en milligrammes pour 100 grammes de substance sèche.

Les quantités de Phytoène sont relatives ; elles ont été déterminées par comparaison, au fluorescimètre, de la fluorescence des différentes solutions diluées de telle sorte qu'elles soient exactement proportionnelles aux valeurs des prises d'essai du matériel végétal.

	Graine	Cotylédons				Plantules	
		4ème jour		8ème jour			
		T	S	T	S	T	S
A - Phytoène	100 %	60 %	78 %	38 %	63 %	0	28 %
B - Phytofluène	présence	0	+	0	0	0	0
C - Carotènes α et β	0, 198	0, 046	0, 172	0, 019	0, 100	3, 34	0, 064
E - Flavochromme (α carotène 5-8 époxyde)	+	traces	traces	0	0	0, 338	traces
F - α Carotène 5-6 époxyde	0, 045	traces	0, 030	0	traces	0, 138	0
H4 - Isolutéi ne	0	+	0	+	0	0, 230	0
H - Violaxanthine	0, 018	traces	0, 025	traces	traces	1, 350	traces

Interprétation des résultats : Le sort des pigments acétonosolubles doit être envisagé dans les tissus de réserve, les cotylédons, et dans les organes en croissance, les plantules.

A priori, les cotylédons doivent, au cours de la germination, être le siège d'un catabolisme ou plus exactement d'un fractionnement des grosses molécules en petites, véhiculables et utilisées par les jeunes tissus en croissance.

Les cotylédons sont chlorophylliens mais la teneur en chlorophylle est assez faible ; celle-ci diminue au cours des 5 premiers jours de germination, mais après cette période de dégradation apparaît une période de synthèse au début de laquelle le rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ augmente.

L'antibiotique ne semble pas agir sur la première phase de destruction mais inhibe la nouvelle formation de pigments du 5ème au 9ème jour.

Il est à noter que le rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ dans les cotylédons traités est d'une façon générale plus élevé que celui des cotylédons témoins.

Chez la plantule la formation des chlorophylles est très fortement inhibée par la Tétracycline ; on ne trouve successivement que 12 %, 12 %, 5 % et 14,5 % de chlorophylles totales chez les plantules traitées par rapport aux témoins les 5ème, 7ème, 8ème et 9ème jours.

Le rapport $\frac{b}{a}$ reste constant ($\# 0,31$) dans les lots traités, à chlorophyllogénèse très réduite, mais par contre ce rapport augmente très sensiblement chez le témoin ($0,31 \longrightarrow 0,41$) et d'autant plus que la chlorophyllogénèse apparaît plus active.

En ce qui concerne les caroténoïdes, la teneur en carotènes hydrocarbonés et hydroxylés est assez faible dans les cotylédons. Au cours de la germination la quantité de chacun de ces composés diminue ; la présence de Tétracycline semble ralentir nettement la disparition de ceux-ci (α et β carotène et phytoène).

Dans les plantules, l'antibiotique inhibe à peu près totalement la formation des pigments caroténoïdes (2 % d'α et de β carotène par rapport au témoin au 8ème jour). Par contre on trouve du Phytoène dans les plantules traitées.

2 - CULTURES DE TISSUS VEGETAUX.

L'action de l'antibiotique a été étudié sur deux tissus cultivés *"in vitro"* : le Topinambour et la Carotte. Nous avons déjà indiqué la raison de ce choix :

- les tissus de Topinambour proviennent de la croissance de morceaux calibrés, prélevés dans le tubercule de cette espèce ; les substances de réserve seront métabolisées en fonction du genre de vie

qu'imposera la culture *"in vitro"*.

- les tissus de Carotte par contre, se développent à partir d'un tissu déjà différencié, adapté par de très nombreux repiquages à la vie en culture *"in vitro"*.

Alors que, au départ de la culture, les tissus de tubercule de Topinambour sont achlorophylliens, blancs, non pigmentés, ceux de Carotte renferment de la chlorophylle et une coupe dans le cal montre une tranche légèrement jaunâtre.

En résumé la croissance des tissus de tubercule de Topinambour, sera accompagnée de l'apparition d'une pigmentation vert-pâle, nouvelle ; cette pigmentation existe dès le repiquage dans les tissus de Carotte : en effet les métabolites des cals repiqués sur milieu nutritif sont les mêmes que ceux des cals arrivés au terme de leur culture puisque l'ensemencement se fait par fractionnement de ceux-ci.

La culture des tissus est poursuivie pendant 30 à 40 jours au bout desquels sont prélevés les échantillons qui seront analysés. L'antibiotique manifestera-t-il une action aussi durable ? Quel pouvait être le rôle de la stérilisation des milieux sur la stabilité de la Tétracycline ? Nous avons essayé de donner une réponse à ces questions en expérimentant sur les cultures de tissus de tubercule de Topinambour.

a) CULTURE DE TISSUS DE TUBERCULE DE TOPINAMBOUR.

Protocole expérimental . Les cultures sont faites comme déjà indiquées ; l'expérience comprend cinq lots de tubes :

- un témoin.
- deux lots dans le milieu nutritif desquels ont été ajoutées des quantités de chlorhydrate de Tétracycline de 10 μg/ml et de 100 μ g/ml avant la stérilisation.
- deux lots renfermant des quantités identiques d'antibiotique, mais les additions au milieu de culture ont été faites aseptiquement après stérilisation, lorsque le milieu gélosé, encore liquide a atteint une température inférieure à 40°C.

Analyse et dosage : Ceux-ci sont réalisés suivant les techniques précédemment décrites.

Avant de donner les résultats nous envisagerons un point particulier de l'analyse concernant la protochlorophylle.

Utilisant pour le dosage des chlorophylles la méthode spectrophotométrique de Comar et Zscheile, nous avons fait des mesures dans les longueurs d'onde de 660, 642,5 et 624 mμ ; or, nous avons souvent trouvé dans cette dernière longueur d'onde des valeurs de densité optique supérieures à celles qui devraient correspondre à la seule présence des chlorophylles a et b. L'explication la plus logique était de soupçonner la présence d'un troisième composé ayant une faible absorption à 660 mμ et une absorption assez importante à 624 mμ ; cette longueur d'onde correspond à un pic du spectre de la protochlorophylle. Les phaophytines ont dans cette longueur d'onde une absorption inférieure à celles des chlorophylles correspondantes ; il ne semblait pas que ce soit la présence de celles-ci qui augmente l'absorption de la solution éthérée à 624 mμ .

A partir d'une solution concentrée de pigments nous avons tenté de mettre en évidence ce composé, présumé être la protochlorophylle, par chromatographie sur papier, l'examen du chromatogramme en lumière du jour ou en ultra-violet ne fait pas apparaître d'autres spots que ceux de la chlorophylle a et de la chlorophylle b. Après élution par l'éther éthylique, nous avons fait les spectres de chacune des fractions : le spectre correspondant à celui de la chlorophylle b est normal ; par contre celui de la chlorophylle a présente des particularités, non dans l'allure générale de la courbe, mais dans les valeurs relatives des absorptions.

Lorsque l'on fait le rapport des densités optiques à 660 mμ et 429 mμ ainsi que celles à 660 mμ et à 624 mμ , les valeurs sont inférieures à celles que l'on devrait obtenir théoriquement en utilisant les coefficients donnés par Comar et Zscheile.

A titre d'exemple nous citerons les résultats obtenus sur un éluat de chromatogramme provenant d'un lot traité par la Tétracycline à 10 μg/ml ; nous avons mesuré au spectrophotomètre des densités optiques respectivement de : 0,77 à 429 mμ , 0,089 à 624 mμ et 0,365 à 660 mμ . Les rapports sont les suivants :

$$\frac{D_{660}}{D_{429}} = 0,42 \quad \text{et} \quad \frac{D_{660}}{D_{624}} = 3,9$$

Les coefficients d'absorption indiqués par Comar et Zscheile sont les suivants :

	429/432 mμ	624 mμ	660 mμ
Protochlorophylle	306	39,9	0,2
Chlorophylle a	135	14,2	102

Les rapports théoriques devraient ainsi être respectivement de 0,755 et 7,1 si la solution ne renfermait que de la chlorophylle a ; les valeurs que nous avons trouvées sont nettement inférieures (0,42 et 3,9).

Dans ce même échantillon nous avons dosé les chlorophylles, a et b et totales en tenant compte de la présence supposée de protochlorophylle ; dans ces conditions les taux de chlorophylle a et protochlorophylle seront, en milligramme par litre :

$$\text{Chlorophylle a} = 9,93\, D_{660} - 0,771\, D_{642,5} - 0,03\, D_{624}$$

$$\text{Protochlorophylle} = 24,93\, D_{624} - 2,55\, D_{660} - 4,60\, D_{642,5}$$

Nous avons trouvé pour 100 g. de substance sèche :

0,19 mg de protochlorophylle
0,72 mg de chlorophylle a

Si nous utilisons les coefficients d'absorption indiqués plus haut, le calcul des rapports nous donnera les résultats suivants :

$$\frac{D_{660}}{D_{429}} = 0,47 \quad \text{et} \quad \frac{D_{660}}{D_{624}} = 4,1$$

La comparaison des résultats calculés et des chiffres trouvés expérimentalement (0,47 et 4,1 au lieu de 0,42 et 3,9) compte tenu des erreurs expérimentales semble confirmer l'hypothèse du départ, c'est à dire la présence simultanée sur la même tache du chromatogramme et donc dans la solution éthérée de chlorophylle a et de protochlorophylle.

Tenant compte de ce fait nous indiquerons les quantités de protochlorophylle utilisant pour le dosage la formule précédente que nous avions déjà signalée au début de ce chapitre.

Carotènes - analyse. Nous indiquerons les valeurs d'absorption maximum et, entre parenthèses, les valeurs indiquées par Goodwin.

- Carotènes α et β : 423 — 447 — 474 mμ ; (α : 420 — 445 — 475 mμ
β : 425 — 451 — 482 mμ)

- Lycopènes et isomères : 415 — 425 — 442 — 480 mμ ; le spectre de cette fraction présente un plateau et un certain nombre de pics dans les longueurs d'ondes indiquées ; un essai de fractionnement par chromatographie sur papier fait apparaître des taches trop voisines pour être séparées et analysées. Cette fraction est éluée par l'éther de pétrole mais la migration est relativement lente ; les absorptions maximum se trouvent dans des longueurs d'onde correspondant à celles du Lycopène et de certains de ses isomères : Poly-cis-Lycopènes I, II, III, IV et V ; nous pensons que cette fraction est

composée d'un mélange de ces composés, sans qu'il soit possible de les déterminer et d'en évaluer les proportions relatives ; l'absorption est assez importante, tout au moins en ce qui concerne la fraction correspondant à l'extrait témoin ; comme il n'est pas possible de séparer les isomères, nous avons dû prendre comme coefficient d'absorption à

$$4700 : E^{1\%}_{1cm} = 2500$$

ce qui équivaut à la valeur moyenne des coefficients d'absorption du Lycopène et de ses isomères.

- Lutéine : 418 — 444 — 474 mμ ; (420 — 447 — 477 mμ)
- Phytoène : fluorescence bleue, intense
- Phytofluène : fluorescence vert olive
- Fraction X : une fraction présente une fluorescence bleu vif comme le phytoène mais ne migre pas lorsque la colonne est traitée par l'éther de pétrole ; elle n'est déplacée que par le mélange éther de pétrole-éther éthylique à 5 %, encore que très lentement ; l'élution se poursuit à une vitesse normale avec le solvant à 10 % d'éther sulfurique. L'éluat n'était pas suffisamment concentré pour que nous ayons pû faire le spectre de ce composé. En résumé, cette fraction se comporte à l'élution comme un composé oxydé, époxyde ou xanthophylle, mais présente une fluorescence absolument comparable à celle du Phytoène.

Résultats quantitatifs : Les résultats sont exprimés en mg pour 100 g de substance sèche pour tous les pigments sauf pour le Phytoène et le Phytofluène ; le Phytoène a été évalué par fluorescimètrie par rapport à l'extrait du tubercule de valeur 100. Le phytofluène a été évalué par comparaison des solutions fluorescentes sous la lampe de Wood.

	Témoin	autoclavé		non autoclavé		Tubercule
		50 μg	100 μg	50 μg	100 μg	
Protochlorophylle	1,095	0,934	0,484	0,820	0,535	0
Chlorophylle a	8,538	3,223	2,046	0,941	0,971	0
Chlorophylle b	3,249	2,323	1,494	0,907	0,882	0
Chlorophylle totale	11,787	5,546	3,542	1,848	1,853	0
Rapport $\frac{b}{a}$	0,38	0,72	0,73	0,96	0,91	-
Carotène & Lycopène et isomères	0,223	0,108	0,066	0,008	traces	traces
	0,193	traces	0	0	0	0,017
Lutéine	0,108	0,092	0,072	0,020	0,018	0
Phytoène	36	38,5	41	112	116	100
Phytofluène	++	++	++	+	+	0
Fraction indéter.	0	+	+	+	+	0

Interprétation des résultats :

1 - L'antibiotique inhibe considérablement la chlorophyllogénèse mais à des degrés divers suivant que l'on considère les chlorophylles a, b ou la protochlorophylle ; la différence apparaît avec plus de netteté lorsque l'on compare les quantités en pourcentage des différents pigments par rapport à ceux du témoin.

	Cals témoin	autoclavé		non autoclavé	
		50 μg/ml	100 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml
Protochlorophylle	100	85,7	44,5	75	49
Chlorophylle a	100	37,7	24	11	11,4
Chlorophylle b	100	71,5	46	27,8	27,2

La quantité de chlorophylle a est moins importante que celle de chlorophylle b dans les lots traités, et cette dernière moins importante également que celle de la protochlorophylle.

Le rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ est, à cet égard, très significatif.

2 - La comparaison des expériences dites "autoclavé" et "non autoclavé" montre que la stérilisation détruit partiellement l'antibiotique ; toutefois l'activité de la fraction non détruite est encore très sensible. La stérilisation détruit plus de 50 % de la quantité de Tétracycline ; l'adjonction au milieu de culture de 100 μg/ml de Tétracycline avant la stérilisation inhibe moins la chlorophyllogénèse que 50 μg/ml ajoutés après stérilisation et refroidissement.

Cette expérience ne permet cependant pas de tirer une conclusion définitive ; elle laisse en effet deux alternatives :

- l'antibiotique est partiellement détruit et l'activité est dûe à la fraction non détruite lors de la stérilisation.
- tout l'antibiotique est détruit lors de l'autoclavage des milieux de culture et ce sont les produits dégradés qui garderont une certaine activité.

L'expérience réalisée sur la culture de tissus de Topinambour ne permet pas de donner une préférence pour l'une ou pour l'autre de ces deux hypothèses, mais ce sont d'autres considérations qui nous permettront d'éliminer la deuxième alternative.

1ère observation : reprenant des expériences sur le Radis nous avons utilisé un lot d'antibiotique dont la date de péremption était dépassée de deux ans ; ce flacon avait été utilisé par erreur. Les lots traités étaient à peu près identiques au témoin (croissance et pigmentation) ; un dosage rapide montrait que les chlorophylles totales étaient presque aussi abondantes dans les plantules traitées que dans les témoins (78 %). Quant à la croissance, il n'y avait pas de différences sensibles entre témoins et traités. Les solutions étaient à concentration de 100 μg/ml.

2ème observation : une solution d'antibiotique portée à l'ébullition pendant une demi-heure perd de 60 à 70 % de son activité ; il en est de même pour une solution conservée à température du laboratoire pendant 4 jours.

Ces expériences et observations ne nous permettent pas d'éliminer d'une façon absolue la deuxième hypothèse, mais rendent plus plausible la première.

Nous avons envisagé jusqu'alors le facteur température sur la stabilité de l'antibiotique, ou, plus exactement, sur son activité ; quelle est l'importance du facteur temps ? L'action de l'antibiotique n'est pas fugace ; l'expérience sur culture de tissus est poursuivie pendant un mois, temps au bout duquel sont faits les prélèvements ; les analyses et les dosages montrent qu'à ce moment encore les perturbations provoquées par l'antibiotique sur les métabolismes et en particulier sur le métabolisme chlorophyllien sont très importants (11 % de chlorophylle a, 27,8 % de chlorophylle b avec une dose de 50 μg/ml de Tétracycline). Une observation précédemment citée montre que l'antibiotique en solution aqueuse est labile. Nous nous trouvons, de nouveau, devant des hypothèses. L'antibiotique est-il plus stable en solution tamponnée du milieu nutritif ? Ou bien s'agit-il d'une action en début de culture sur des cellules en voie de différenciation, action se poursuivant ensuite durant la croissance des cals ? A ces deux hypothèses nous ne saurions donner une préférence.

Nous pouvons résumer en disant que, dans ces conditions d'expérience, l'activité de l'antibiotique est diminuée par stérilisation du milieu de culture le renfermant, mais que l'activité résiduelle est encore suffisamment importante puisque dans les conditions les plus défavorables de l'expérience (50 μg/ml) la chlorophyllogénèse est ralentie de moitié.

3 - Les lésions biochimiques provoquées par l'antibiotique au niveau de la génèse des caroténoïdes apparaissent encore plus importantes que celles qui affectent la chlorophyllogénèse. Certains caroténoïdes disparaissent presque complètement sous l'effet de doses élevées d'antibiotique (100 μg/ml). La Tétracycline inhibe plus la formation des carotènes que celle des xanthophylles :

- 4 % de α et de β carotène, 18 % de lutéine avec 50 μg/ml
- traces de α et de β carotène, 17 % de lutéine avec 100 μg/ml

En ce qui concerne le Phytoène, l'action est inverse ; ce polyène incolore existe en quantité relativement importante dans le tubercule de Topinambour ; dans les tissus témoins cultivés la concentration en phytoène diminue au cours de la croissance des cals ; au contraire, ce composé reste en concentration identique ou même semble s'accumuler dans les tissus traités (50 et 100 μg/ml "non autoclavé"). En résumé, teneurs en phytoène et en carotènes varient de façon inverse.

Le Phytofluène, absent dans le tubercule, est présent dans tous les cals, mais en quantité supérieure dans les lots témoins que dans les lots traités.

b) CULTURE DE TISSUS DE CAROTTE.

Protocole expérimental : Les cultures sont faites sur le milieu de culture déjà décrit (milieu de Heller, acide indolylacétique 3×10^{-7} , glucose 3 %). Au milieu nutritif de deux lots sont ajoutés après refroidissement des quantités de chlorhydrate de Tétracycline aux doses respectives de 10 μg/ml et 100 μg/ml. Les pigments acétonosolubles sont extraits de cals de trente jours.

Analyse et dosage : Les particularités sont les mêmes que celles que nous avons signalées dans le cas de la culture de tissus de Topinambour.
Les pigments caroténoïdes déterminés sont les suivants :

1 - Elution par l'éther de pétrole :

Phytoène et Phytofluène : fluorescence caractéristique.
α et β Carotènes : spectre dans l'hexane : 425 - 447 - 475 mμ .

2 - Elution par l'éther de pétrole-éther éthylique 10 % :

Deux fractions colorées, l'une jaune, nette, à maxima d'absorption dans les longueurs d'onde de 418 - 444 - 474 mμ , dans l'hexane *Lutéine* (Goodwin : 420 - 447 - 477).

La deuxième fraction présente, sur la colonne une teinte jaune pâle ; en lumière ultra-violette cette fraction n'est pas fluorescente mais par contre l'examen sous lampe de Wood fait apparaître une troisième fraction proche de la seconde, présentant une légère fluorescence gris verdâtre ; les spectres de ces deux fractions font apparaître des pics d'absorption à :

439 - 476 mμ pour la fraction colorée et
328 - 348 - 371 mμ pour la fraction incolore ; cette fraction serait du *Phytofluénol.* (Goodwin : 332 - 348 - 368).

En ce qui concerne la fraction jaune pâle les trop faibles quantités extraites ne nous ont pas permis de faire de spectre dans d'autres solvants et les valeurs que nous avons déterminées pourraient aussi bien se rapprocher de celles de *la Violaxanthine* ou de *l'Isolutéine* (Goodwin : 443 - 472 et 442 - 471) ; cette fraction est la dernière éluée et sa migration lente concorde avec celle des caroténoïdes à 3 ou 4 atomes d'Oxygène, c'est à dire des époxydes de xanthophylles ; cette considération ne permet pas de choisir l'un des composés cités puisque l'un et l'autre présente cette particularité : Violaxanthine = 5-6 , 5'-6' diépoxyzéaxanthine.

Isolutéine = 5-6 époxylutéine.

Nous appellerons ce composé mal déterminé *Epoxy-xanthophylle* dans les tableaux de résultats.

Résultats quantitatifs : Résultats exprimés en mg/100 g de substance sèche.

	Témoin	10 µg	100 µg
Protochlorophylle	1,29	1,71	0,077
Chlorophylle a	7,25	6,48	0,72
Chlorophylle b	3,16	4,86	0,85
Chlorophylle totale	10,42	11,34	1,57
Rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$	0,43	0,75	1,17
Carotènes α et β	1,188	2,061	0,516
Lutéine	0,706	0,217	0,077
Phytofluénol	0,193	0,099	0,093
Epoxyxanthophylle	traces	traces	0
Phytoène (*)	100	90	240
Phytofluène	+	+	++

(*) Le Phytoène a été évalué par fluorescimétrie par rapport à l'extrait des lots témoins.

Interprétation des résultats : L'activité antibiotique sur la chlorophyllogénèse est sensiblement identique à celle que nous avons constatée sur les cultures de tissus de Topinambour : la chlorophylle a est en quantité relativement moins importante que la chlorophylle b dans les lots traités , et les rapports $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ sont d'autant plus élevés que la concentration en antibiotique est plus grande. Mais si l'on fait le pourcentage des chlorophylles par rapport au témoin, le tableau suivant :

	Témoin	10 µg	100 µg
Protochlorophylle	100	131	6
Chlorophylle a	100	89	10
Chlorophylle b	100	153	27
Chlorophylle totale	100	109	11

montre que, contrairement à l'expérience précédente, la formation de protochlorophylle est plus diminuée que celle des autres pigments, tout au moins avec des doses élevées (100 µg).

Une dose de 10 µg paraît stimuler légèrement la chlorophyllogénèse totale ; en réalité le taux de chlorophylle a est légèrement diminué alors que la chlorophylle b s'accumule.

En ce qui concerne le sort des carotènes nous retrouverons également des points communs avec l'expérience "Topinambour", mais aussi des dissemblances.

Points communs : les carotènes colorés ont une formation inhibée par la Tétracycline ; à l'inverse le Phytoène et le Phytofluène s'accumulent.

Dissemblances : dans le Topinambour les composés hydrocarbonés (carotènes) subissaient plus intensément l'action de l'antibiotique que les composés oxydés (xanthophylles) ; dans la culture de tissus de Carotte on observe des résultats exactement inverses :

11 % de lutéine et 43 % d'α et β carotènes à 100 μg/ml
31 % de lutéine et 170 % d'α et β carotènes à 10 μg/ml

Alors que le Phytofluénol diminue dans les lots traités, le Phytofluène s'accumule.

Enfin et de même que pour les chlorophylles, il apparaît que les doses faibles d'antibiotique provoquent une augmentation dans la formation de certains caroténoïdes, α et β carotènes.

III - RECHERCHES D'UNE ACTION ANTAGONISTE A CELLE DES TETRACYCLINES.

Parmi les nombreuses hypothèses mises en avant et susceptibles d'expliquer le mode d'action des Tétracyclines, différents auteurs ont signalé le pouvoir chélatant des antibiotiques de ce groupe (Albert-1953, Loomis-1950, Brody et collaborateurs-1954) ; pouvoir chélatant suffisamment fort pour lier différents ions métalliques. La Chlorotétracycline, par exemple, peut à concentration assez élevée, inhiber des systèmes d'oxydation et de phosphorylation oxydative nécessitant la présence d'ion Magnésium ; cette inhibition ne se produit pas en présence d'un excès de Magnésium.

La chélation du Manganèse par la Tétracycline est à l'origine d'un travail de Saz qui étudie le comportement d'un système enzymatique bactérien réducteur des groupements nitrés. Un certain nombre de considérations ont toutefois fait rejeter la conclusion suivant laquelle l'action chélatante des Tétracyclines serait la raison majeure de l'activité antibiotique spécifique.

D'autres auteurs ont signalé des renversements d'inhibition de croissance par ces antibiotiques grâce à des coenzymes ou des vitamines.

L'activité antichlorophyllienne peut n'être qu'une incidence de l'action primaire de l'antibiotique, ou bien cette propriété est spécifique d'un des groupements chimiques de la molécule antibiotique ; ce serait dans ce cas non pas la molécule entière, mais une portion de cette molécule qui serait responsable de l'action antichlorophyllienne. Dans ces conditions, le rôle chélatant de certaines fonctions de la molécule de Tétracycline pourrait être déterminant de la chlorose observée chez les plantules traitées. Ces considérations nous ont incité à essayer de rétablir la formation des pigments chlorophylliens en plaçant les plantules non pas en présence du seul antibiotique, mais en adjoignant des ions métalliques connus pour le rôle déterminant qu'ils ont dans la chlorophyllogénèse :

Mg^{++} Fe^{++} et K^{+}

ESSAI D'ANTAGONISME AVEC DES IONS MINERAUX.

Protocole expérimental Des graines de Radis sont trempées, pendant 24 heures dans une solution de chlorhydrate de Tétracycline à 100 μg/ml, lavées à l'eau ordinaire, puis placées sur coton imbibé des solutions suivantes :

- 2 - eau ordinaire : "Témoin Tétracycline"

- 3 - sulfate de Magnésium à concentration de 0,2 %

- 4 - sulfate de Magnésium -id- 0,5 %

- 5 - nitrate de Potassium -id- 0,01 %

- 6 - sulfate ferreux -id- 0,001 %

- 7 - NO_3K 0,1 % + SO_4Mg 0,5 % + SO_4Fe 0,001 %

- 8 - NO_3K 0,1 % + SO_4Mg 0,2 % + SO_4Fe 0,001 %

- 9 - NO_3K 0,01 % + SO_4Mg 0,5 % + SO_4Fe 0,001 %

- 10- NO_3K 0,01 % + SO_4Mg 0,2 % + SO_4Fe 0,001 %

Les solutions de sulfate de Magnésium sont relativement concentrées de façon à assurer une anihilation complète de l'action chélatante présumée de l'antibiotique vis-à-vis de l'ion métallique .

Parallèlement à cette expérience, des graines de Radis trempées dans l'eau ordinaire ont été déposées sur coton imbibé des mêmes solutions salines.

Les graines déposées sur coton imbibé d'eau ordinaire représenteront le lot témoin I.

Les prélèvements des échantillons sont faits le 8ème jour : les parties aériennes de 40 plantules (tiges et feuilles) sont pesées puis extraites par l'acétone hydratée. Les dosages sont faits comparativement à la solution acétonique témoin, les solutions chlorophylliennes ayant été ramenées au même volume que celui de la solution témoin ; dans ces conditions les résultats correspondent à la quantité de chlorophylle synthétisée par chacun des lots dans ses conditions particulières de germination et de croissance.

Résultats :

Conditions de culture	Poids frais de 40 échantillons en g		Pourcentage de chlorophylles par rapport au lot témoin	
	Sans	Avec antibio.	Sans	Avec antibio.
1 - Eau ordinaire	3,410	-	100 %	-
2 - Solution de Tétracycline (100 g/ml)	-	2,854	-	6 %
3 - SO_4Mg 0,2 %	3,200	3,150	98 %	21 %
4 - SO_4Mg 0,5 %	1,920	1,670	106 %	17 %
5 - NO_3K 0,1 %	5,010	4,150	100 %	11 %
6 - SO_4Fe 0,001 %	3,385	2,905	96 %	8 %
7 - K^+O, 1 % + Mg^{++}0,5 % + Fe^{++}0,001				
7 - K^+O, 1 % + Mg^{++}0,5 % + Fe^{++}0,001 %				
7 - K^+O, 1% + Mg^{++}0,5% + Fe^{++}0,001%	5,430	3,980	105 %	23 %
8 - K^+O, 1% + Mg^{++}0,2% + Fe^{++}0,001%	7,365	5,200	101 %	26 %
9 - K^+O,0,01%+Mg^{++}0,5%+Fe^{++}0,001%	3,325	2,420	106 %	23 %
10 - K^+O,0,01%+Mg^{++}0,2%+Fe^{++}0,001%	5,740	3,785	99 %	28 %

Les résultats de dosages dans les lots parallèles, non traités et qui se sont développés sur les mêmes solutions salines, ne présentent aucune particularités ; les quantités relatives de chlorophylles par rapport au témoin "eau" sont comprises entre 96 et 106 %. L'apport d'éléments minéraux dans ces conditions d'expérience n'augmente pas sensiblement le rendement de la chlorophyllogénèse normale.

Les effets sur la croissance sont difficilement comparables ; cependant la comparaison entre lots traités ou non et se développant sur solution saline identique montre que les éléments minéraux ne paraissent pas diminuer la toxicité initiale de l'antibiotique. On peut remarquer la toxicité de l'ion Mg^{++} et l'antitoxicité de l'ion K^{+} vis-à-vis de ce dernier.

L'action des éléments minéraux sur le rétablissement de la chlorophyllogénèse semble par contre beaucoup plus intéressante. Si les éléments Fe^{++} et K^{+} seuls n'apportent pas ou que très peu de changement à l'activité de l'antibiotique, le Mg^{++} apparait comme plus digne d'intérêt puisque, même utilisé seul à des doses phytotoxiques (0,5 %) il diminue l'effet "antichlorophyllogénétique" de la Tétracycline . Dans les 4 séries d'expérience utilisant les mélanges K^{+}, Mg^{++} et Fe^{++} l'action inhibitrice de l'antibiotique est notablement diminué ; il semble, d'après nos constatations précédentes, que ce soit surtout au Magnésium qu'il faille attribuer cette activité antagoniste. Cependant, l'addition des éléments minéraux en excès ne rétablissent qu'en partie le taux de chlorophylles et, dans les meilleures conditions, ce taux atteint 28 % au lieu de 6 %.

Ces résultats semblent bien montrer qu'il existe une action de chélation des Tétracyclines vis-à-vis de certains éléments minéraux et notamment le Magnésium. L'inhibition de la chlorophyllogénèse peut donc être considérée comme imputable à l'action chélatante de l'antibiotique vis-àvis de l'ion Magnésium, mais en partie seulement car, s'il est possible de réduire l'action antichlorophyllienne des Tétracycline (de 6 % à 28 %). Cette particularité n'est probablement dûe qu'à un ou certains groupements de la molécule, mais non à la molécule entière, sinon nous aurions pu restituer le phénomène chlorophyllien dans son intégralité.

IV- INTERPRETATIONS GENERALES.

A - CHLOROPHYLLES.

Depuis les travaux de Shemin et de Granick, les précurseurs du noyau chlorophyllien et les étapes de formation de celui-ci ne semblent pas devoir donner lieu à des controverses importantes. Par l'emploi de Carbone et d'Azote marqués, Shemin a démontré que l'acide succinique et le glycocolle étaient à l'origine de l'acide δ aminolévulinique qui par condensation de deux molécules forme un dérivé pyrrolique : le porphobilinogène. Le mode de groupement de ces composés pyrroliques en protoporphyrine n'est pas encore très précisé, mais il ne fait aucun doute quant à l'origine glycinique de l'azote et à la présence du ^{14}C de l'acide succinique dans la molécule de porphyrine.

Des mutants de Chlorelles ont permis à Granick de suivre, par étapes, la formation de Protochlorophylle à partir de Protoporphyrine. Mais les derniers stades de formation des Chlorophylles ont été l'objet d'hypothèses assez contradictoires. De quatre hypothèses dans la biogénèse de ces derniers composés, c'est à dire :

- formation indépendante des composés a et b,
- formation initiale de chlorophylle b,
- formation des chlorophylles a et b à partir d'un précurseur commun,
- formation de chlorophylle b à partir de la chlorophylle a,

c'est cette dernière qui a été le plus souvent retenue, notamment par Willstätter, puis Granick ; cependant aucun résultat expérimental n'était venu confirmer formellement cette hypothèse ; il semble que

Godnev, Rotfarb et Chlick aient apporté cette preuve. Ces auteurs utilisent une chlorophylle a et une chlorophylle b renfermant du ^{14}C. Chacun des pigments est purifié par une série de chromatographies, puis dissout dans de l'huile de tournesol en présence de pigments noirs afin d'éviter une destruction éventuelle par la lumière. Ces solutions sont placées dans la cavité de jeunes feuilles d'oignons à peine verdies. Celles-ci sont ensuite placées dans des éprouvettes remplies d'eau et exposées à une lumière diffuse. Au bout de deux jours, les chlorophylles néoformées sont extraites, séparées et analysées. Ces expériences ont permis aux auteurs de faire les constatations suivantes :

- des chlorophylles étrangères, exogènes, peuvent être introduites dans la cellule de la feuille, passer dans les chloroplastes, et s'incorporer partiellement, dans les processus du métabolisme .
- une molécule de chlorophylle a pure, introduite dans le tissu vivant d'une feuille est capable de se transformer en chlorophylle b.
- l'inverse ne se produit pas : la chlorophylle b pure ne donne pas naissance à de la chlorophylle a.

La biogénèse des chlorophylles doit donc être schématisée :

Protochlorophylle ⟶ Chlorophylle a ⟶ Chlorophylle b.

Avant d'envisager l'action des Tétracyclines sur ce métabolisme, nous rappellerons ici une variation dy tion du rapport $\frac{\text{chlorophylle b}}{\text{chlorophylle a}}$ souvent constatée sur des plantules témoins et que l'on peut résumer ainsi : le rapport $\frac{b}{a}$ atteint une valeur constante dans les feuilles adultes mais ce rapport est généralement plus élevé dans les jeunes feuilles en croissance, lors des périodes de synthèse intense. Si l'on suit dans le temps l'évolution des concentrations de chlorophylles a et b, on constate que leur formation est rapide jusqu'à ce que chacun des composés ait atteint une concentration maximum ; mais la chlorophylle b atteint plus rapidement le niveau de sa concentration normale alors que se poursuit encore pendant quelque temps l'augmentation du taux de chlorophylle a. Ainsi le rapport $\frac{b}{a}$ est plus grand lors de cette première phase de formation active et celui-ci ne devient constant que lorsque l'un et l'autre des deux composés a atteint son taux normal.

Cette disproportion de la chlorophylle b par rapport à la chlorophylle a, a été signalée par Wettstein dans les bourgeons des feuilles de certaines Graminées et cette constatation faisait conclure l'auteur à l'impossibilité pour une chlorophylle d'être le précurseur de l'autre.

A la lumière de ces observations, que nous apporte l'effet antibiotique sur le processus métabolique de ces pigments ? Les Tétracyclines inhibent la chlorophyllogénèse mais les différentes expériences montrent que cette action n'a pas la même intensité suivant les espèces auxquelles on s'adresse. De plus, le phénomène antichlorophyllien n'est pas proportionnel au phénomène inhibiteur de croissance et ne semble pas directement lié à celui-ci.

Des doses faibles d'antibiotique (1 μg/ml sur le Radis) peuvent déjà posséder une action antichlorophyllienne facilement décelable par des analyses mais respectant le phénomène de croissance. L'action de l'antibiotique, appliqué à doses suffisantes au stade de la graine, n'est pas fugace et se prolonge durant le temps de l'expérience (10 à 12 jours).

L'action antichlorophyllienne est d'autant plus importante que les Tétracyclines ont été appliquées plus prématurément : l'action est maximum lorsque la graine a été immergée dans la solution antibiotique. Par contre, les plantules âgées de quelques jours et placées dans une solution de Tétracycline présentent des troubles beaucoup moins importants : les feuilles sont vertes et seul un dosage des pigments permet de mettre en évidence la chlorose. Cet aspect de l'activité assez faible de l'antibiotique sur une plantule déjà bien développée est particulièrement frappant dans les expériences faites en serre

sur le Sarrasin, la Moutarde et le Haricot : il est nécessaire d'arroser quotidiennement les plantes avec des doses élevées de Tétracyclines pour observer une diminution du taux de chlorophylles, encore que ce phénomène ne soit observable que sur les feuilles les plus jeunes. Dans cette série d'expériences, le comportement des plantes dans des conditions différentes de culture (différence des sols) nous a également permis de conclure que l'inhibition de croissance et celle de la chlorophyllogénèse ne sont pas des phénomènes directement dépendants.

Dans les cultures de tissus végétaux, les troubles métaboliques affectant la formation des chlorophylles apparaissent encore plus importants, non pas quant aux pourcentages d'inhibition mais par le déséquilibre des proportions de chlorophylles a et b. Une dose assez importante de chlorhydrate de Tétracycline (100 μg/ml) a même permis d'obtenir avec des tissus de Carotte une quantité de chlorophylle b supérieure à celle de la chlorophylle a. Il semble que l'augmentation importante du rapport $\frac{b}{a}$ chez les tissus poussant sur milieu renfermant l'antibiotique, doit être recherchée, en partie, dans l'interprétation que nous avons donnée au début de ce chapitre au sujet des variations du rapport des quantités de chlorophylles au cours de la formation et de la croissance de la feuille. L'antibiotique ralentit la formation des chlorophylles de telle sorte, qu'en fin d'expérience, ces pigments sont encore dans la phase initiale de leur formation alors que dans les tissus témoins ces composés sont déjà arrivés à leur concentration normale. Cette explication n'est cependant pas suffisante car, à quelque stade de croissance que ce soit, nous n'avons jamais obtenu dans les cals témoins des rapports chlorophylle b/chlorophylle a aussi grands (0,50 au plus).

Quoi qu'il en soit, l'antibiotique appliqué sur des tissus en voie de prolifération ou de différenciation (embryons ou cultures de tissus) provoque une inhibition de la chlorophyllogénèse ; mais à quel niveau ? D'une façon générale, et surtout apparente sur les cultures de tissus, l'inhibition de la chlorophyllogénèse ne se traduit pas par une baisse proportionnellement identique des deux composants ; la diminution du taux de chlorophylle b est moins importante que celle de la chlorophylle a.

Nous avons montré que la blocage de la chlorophyllogénèse ne pouvait être rapporté essentiellement à une action chélatante des Tétracyclines. L'activité primordiale de ce groupe d'antibiotique réside dans une inhibition de la protéogénèse et il est probable que celle-ci soit à l'origine des troubles métaboliques constatés dans la formation des pigments. Nous pouvons envisager deux aspects des rapports existant entre ces métabolismes :

1/ fixation des chlorophylles sur leur support protidique.
2/ enzymes concourant à l'élaboration de ces pigments.

La fraction protidique fixant le pigment est assez mal connue ; l'action antichlorophyllienne de l'antibiotique pourrait être due à une inhibition dans la formation des protéines constituant le support au sein des chloroplastes. Si tel était le cas, nous devrions logiquement constater une diminution proportionnellement aussi importante de chlorophylle b que de chlorophylle a, ce qui est contraire aux résultats expérimentaux.

Il semble que ce soit surtout au niveau des réactions enzymatiques qui précèdent la formation de la chlorophylle a que l'action antichlorophyllienne des Tétracyclines doit être recherchée. Nos résultats expérimentaux nous mettent malheureusement dans l'impossibilité de pouvoir mieux préciser ce mécanisme d'action.

B - PIGMENTS CAROTENOIDES.

Les Tétracyclines provoquent des troubles importants dans la génèse des caroténoïdes. L'évaluation du taux de chaque composé montre que leur concentration ne varie pas dans des proportions identiques ; si la formation des carotènes et des xanthophylles est à peu près réduite à néant, il n'en est pas de même des polyènes incolores qui, la plupart du temps, s'accumulent dans les organismes soumis à l'action de l'antibiotique.

La graine de Pois renferme un certain nombre de caroténoïdes : α et β carotènes, phytoène et un peu de xanthophylle. Au cours de la germination ces composés disparaissent beaucoup plus rapidement que ceux contenus dans les graines traitées. Dans les plantules traitées la biosynthèse des carotènes

α et β, des époxydes et des xanthophylles (Isolutéine et Violaxanthine) est à peu près nulle ; à ce phénomène correspond une persistance du phytoène dans les tissus cotylédonaires.

Les cultures de tissus représentent un matériel végétal fort différent. Le tubercule de Topinambour contient presque exclusivement du Phytoène ; les cals qui en sont issus synthétisent du Lycopène, de l'α et β carotène et de la lutéine ; cette formation est accompagnée d'une diminution de la quantité de phytoène originale. A l'inverse, dans les cultures faites sur milieu renfermant de la Tétracycline, la formation des polyènes hydrocarbonés est à peu près nulle ; la lutéine est fortement diminuée mais moins semble-t'il, que les autres caroténoïdes ; la quantité de phytofluène est également inférieure à celle du témoin. Par contre le phytoène se rencontre en quantité supérieure à celle du tubercule, ce qui suggère une formation nouvelle de ce composé pendant la durée d'expérience de cette culture.

Dans la culture de tissus de Carotte, on observe également une inhibition dans la formation des carotènes α et β mais en apparence moins importante que celle de la lutéine. L'accumulation de Phytoène, sous l'effet antibiotique, est encore plus importante que celle que l'on a constatée dans la culture de tissu de Topinambour. Cette accumulation suggère que le blocage de la caroténogénèse doit être recherché parmi les précurseurs immédiats des carotènes et non dans le mécanisme élaborateur de la chaîne hydrocarbonée à partir des acides acétique, mévalonique ou de composés caroténogéniques tels que la leucine.

Porter et Lincoln (1950), considéraient que les précurseurs immédiats du Lycopène étaient des polyènes saturés et que les étapes de la formation de ce composé pouvaient ainsi être schématisées ;

$$\text{Tétrahydrophytoène} \xrightarrow{-4H} \text{Phytoène} \xrightarrow{-4H} \text{Phytofluène} \xrightarrow{-4H}$$

$$\gamma\text{Carotène} \longrightarrow \text{Tétrahydrolycopène} \quad (= \text{Neurosporène}) \longrightarrow \text{Lycopène}$$

Le βcarotène serait finalement formé par cyclisation du Lycopène avec possibilité de passage par le γcarotène.

Or, l'étude de la nature chimique du Phytoène, Phytofluène et γCarotène fait apparaître que ces trois composés sont des isomères en $C_{40}H_{64}$, ne différant que par l'emplacement de leurs doubles liaisons :

γ Carotène = 5, 6, 7, 8, 5', 6', 7', 8' octahydrolycopène (Nash, Quackenbush et Porter)
Phytoène = 7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12 octahydrolycopène (Rabourn et coll., Zechmeister et Koë)

La nature du Phytofluène (Zechmeister et Sandoval, 1945 et 1946) est plus controversée et Goodwin (1958) pense que de nouvelles investigations dans ce sens sont encore nécessaires.

Le schéma de Porter et Lincoln ne peut donc être admis dans son intégralité : (Mackinney et Chichester). L'évolution des composés dans des mutants de Tomates, chez *Phycomyces Blakesleeanus*, *Rhodospirillum rubrum* certaines Chlorelles mutées, fait apparaître des discordances dans les hypothèses proposées par les divers auteurs. Pour Goodwin, le β carotène est formé chez *Phycomyces Blakesleeanus*, au moins jusqu'à un certain point, à partir de précurseurs endogènes qui ne sont probablement pas ceux de la série Phytoène. Les expériences de cet auteur font appel à un réactif biologique bloquant la synthèse des Carotènes : la Diphénylamine (D P A) ; ce corps provoque concurremment une accumulation du Phytoène. L'élimination de la Diphénylamine entraîne la synthèse rapide du βCarotène mais sans faire diminuer la concentration de Phytoène.

Cette action de la D P A est à rapprocher de celle des Tétracyclines qui provoquent également une accumulation de Phytoène. Il est certain que ce phénomène est en relation étroite avec l'inhibition de la formation des polyènes insaturés, mais nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que le Phytoène soit l'un des précurseurs immédiats de ces composés.

En ce qui concerne les troubles apportés à la formation des composés oxydés (xanthophylles et époxydes), leur diminution non proportionnelle à celle des composés seulement hydrocarbonés, et d'autre part les résultats observés dans des expériences conduites avec des espèces différentes (cultures de Carotte et de Topinambour *"in vitro"* laissent à penser que les Xanthophylles et les Carotènes ne dérivent pas nécessairement les uns des autres mais qu'ils peuvent être formés par des voies parallèles ; cette hypothèse, en accord avec les travaux de Goodwin, a été également formulée par Baraud.

En résumé, nous avons surtout mis en évidence les perturbations importantes que provoquent les Tétracyclines au niveau de la caroténogénèse ; ce phénomène pourrait être très utile lors de travaux concernant la biosynthèse de ces composés. Nos investigations ne sont toutefois pas suffisantes pour permettre de conclure sur le mécanisme même de la caroténogénèse. Nous pensons cependant que l'action de l'antibiotique se traduit ici encore par un blocage dans la formation de la partie protidique d'enzymes nécessaires à l'élaboration des pigments liposolubles.

CHAPITRE VI

INTERPRÉTATIONS GÉNÉRALES DU MÉCANISME D'ACTION DES TÉTRACYCLINES

Nous avons, au cours de ce travail, utilisé un matériel d'expérimentation aussi divers dans sa forme que dans le choix des espèces végétales. Ceci devait faire apparaître une diversité d'actions parmi lesquelles il est toutefois possible d'entrevoir une communauté d'effets liés à l'antibiotique et qui peuvent être ainsi résumés.

Des doses usuelles et même importantes d'antibiotique n'empêchent pas la germination des graines. Par contre, la croissance est ralentie; l'inhibition du développement des tiges et des racines est proportionnelle à la concentration de Tétracyclines auxquelles les graines ont été soumises; il faut noter que l'intensité du phénomène est variable suivant les espèces. L'action est d'autant plus importante que l'antibiotique a été appliqué plus prématurément, le maximum d'action s'observant lorsque l'embryon est mis en contact avec l'antibiotique dans le temps de son hydratation. Pratiquement ces composés ne possèdent pas d'action sur un individu déjà différencié. L'activité sur le développement de cultures *" in vitro "* de tissus d'espèces différentes nous conduit généralement aux mêmes constatations; cependant, sur un tel matériel, les Tétracyclines possèdent , à doses faibles une activité stimulatrice.

La croissance est un reflet de l'activité protidique. Il apparaît que c'est à ce niveau que se situe l'activité initiale de l'antibiotique. En effet, dès les premières heures de traitement, la réserve libre des amino-acides libres est considérablement modifiée; on note une accumulation importante de ceux-ci, mais sans que cette augmentation soit à un même degré pour chacun d'eux. Les bilans azotés mettent en évidence un blocage de la protéogénèse.

En ce qui concerne les variations du taux des acides organiques, il semble que celles-ci soient immédiatement liées à celles des métabolites azotés; les relations qui par de nombreuses chaînes relient ces deux métabolismes ne sauraient mettre à l'abri le métabolisme des acides organiques lorsque des troubles importants affectent celui des acides aminés.

Les Tétracyclines n'inhibent pas le phénomène respiratoire dans les premiers jours de germination et de croissance. La diminution de l'intensité respiratoire n'apparait pas avant le 4ème jour de croissance; il apparaît donc que l'action des antibiotiques sur ce phénomène est indirect, secondaire; ceux-ci ne sont pas au sens propre du mot des agents dépresseurs de la respiration.

L'inhibition de la formation des pigments liposolubles par les Tétracyclines ne semble pas non plus relever d'une action spécifique, sinon il serait possible de décolorer les feuilles ou tout au moins d'empêcher la genèse des pigments chlorophylliens en plaçant les plantules déjà développées dans une solution antibiotique. Or nous avons vu que, dans de telles conditions, il n'était possible, avec des doses élevées d'antibiotique renouvellées quotidiennement, d'obtenir qu'une chlorise peu importante, et en tout cas sans aucune commune mesure avec celle que l'on peut observer avec des doses usuelles appliquées une seule fois pendant quelques heures au niveau de la graine.

Toutes ces considérations nous font situer l'action initiale des Tétracyclines au niveau de la protéogénèse.

Les autres manifestations :

- troubles du métabolisme des acides organiques,
- dépression tardive de la respiration,
- inhibition de la synthèse des pigments liposolubles,
- troubles dans le régime hydrique,

ne doivent être que des effets secondaires liés à la lésion biochimique primaire.

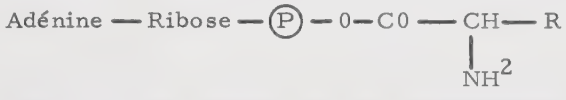
En effet, la protéogénèse ne représente pas seulement l'élaboration d'éléments plastiques, mais aussi celle de la fraction protidique des enzymes. Dans la graine un certain nombre de diastases sont en réserve qui assureront les débuts de la germination et de la croissance, mais très rapidement doivent apparaître des enzymes nouveaux ou de remplacement. Or, les Tétracyclines ne possèdent pas d'action sur les enzymes préformés. mais ils inhibent, comme le Chloramphénicol, la synthèse induite de certaines diastases (Hahn sur Escherichia coli).

Cette hypothèse est en accord avec nos résultats puisque nous avons montré que les antibiotiques agissaient avec d'autant moins d'efficacité qu'ils étaient appliqués plus tardivement, c'est à dire sur des organismes déjà plus différenciés, donc mieux équipés en systèmes enzymatiques.

Si toutes ces observations nous permettent de localiser l'activité des Tétracyclines au niveau de la protéogénèse, il apparaît plus difficile de mieux préciser leur mécanisme.

Actuellement, on admet que la protéogénèse se déroule suivant plusieurs phases qui peuvent être ainsi résumées :

Les amino-acides libres sont activés dans une réaction faisant intervenir l'A T P; cette réaction conduit à la formation d'une liaison énergétique riche sur le carboxyle de l'amino-acide. Cette forme activée pourrait être un composé amino-acide-adénoside mono phosphate (AMP) de la forme :



Les amino-acides activés seraient transférés sur quelque polynucléotide qui déterminerait leurs places spécifiques; le polynucléotide, probablement une nucléoprotéine, servira ainsi de modèle à la protéine en formation, la topographie de l'espace laissé par les bases puriques et pyrimidiques déterminant la position des acides aminés. Enfin la protéine sera libérée de son "moule"; la formation des chaînes peptidiques entre amino-acides voisins résultera du clivage des liaisons qui unissent le phosphate terminal et le carboxyle de l'amino-acide.

D'autres hypothèses envisagent la formation simultanée et interdépendante des protéines et des nucléotides.

Nous n'avons pas étudié l'action des Tétracyclines sur la synthèse des acides nucléiques. Cependant les faits suivants laissent supposer que ces antibiotiques n'agissent pas sur ces composés :

1/ La germination n'est pas stoppée par ces antibiotiques; or la multiplication cellulaire est en relation étroite avec le métabolisme des acides nucléiques.

2/ Hahn a montré que chez *Escherichia coli* les Tétracyclines et le Chloramphénicol bloquaient la protéogénèse provoquant une bactériostase pendant laquelle il est possible de suivre l'accumulation de l'acide désoxyribonucléique.

3/ Šormova et Šorm indiquent que l'action antibiotique ne doit pas être recherchée au niveau du métabolisme des acides nucléiques, celui-ci n'étant pas sensiblement affecté.

Toutes ces observations permettent de penser que le modèle nucléoprotidique n'est pas altéré et que c'est, soit sur l'activation des acides aminés, soit sur la fixation des amino-acides activés que se situe l'action primordiale de l'antibiotique; dans cette dernière hypothèse on pourrait envisager qu'une certaine conformation de structure permettrait à la molécule antibiotique de se placer en certains espaces de la spirale d'acide ribonucléique, désordonnant ainsi l'agencement de chaines peptidiques.

L'étude du mode d'action de ce groupe d'antibiotique se confond à ce niveau avec la recherche biochimique du mécanisme de la protéogénèse et ce problème ne sera résolu que dans la mesure où l'autre sera en voie de l'être. Cependant, si telle est l'activité des Tétracyclines, leur emploi pourra corélativement, représenter un réactif biologique intéressant dans une telle recherche.

CONCLUSIONS

1°- Des graines de diverses espèces ont été mises en contact avec des solutions de Tétracyclines (Tétracycline, Chlorotétracycline, Oxytétracycline) de concentrations différentes. Aux doses usuelles, ces antibiotiques n'entravent pas la germination, mais les plantules issues de ces graines sont inhibées dans leur croissance. Les différentes espèces ne présentent toutefois pas la même sensibilité.

2°- Une application d'antibiotique sur la graine de Pois ou sur son système radiculaire inhibe la formation des racines latérales.

3°- Ajoutés au milieu de culture *" in vitro"* de divers tissus, ces antibiotiques, utilisés à concentration supérieure à 1 mg/l, provoquent une inhibition de la croissance des cals; par contre, des doses faibles (0,1 mg/l) stimulent le développement des cultures de Carotte, Topinambour et Vigne-vierge et plus encore celui des cultures de Crown-gall de Scorzonère.

4°- Le régime hydrique des plantules et des tissus traités est perturbé; l'hydratation des individus traités est moins importante que celle des témoins.

5°- La respiration de plantules de trois espèces différentes, choisies en fonction de la nature de leurs réserves cotylédonaires, a été étudiée en fonction de l'application de Tétracyclines. Ces antibiotiques ne sont pas directement des dépresseurs respiratoires; cependant une diminution de cette intensité apparaît tardivement (4ème jour après le traitement).

Le quotient respiratoire du Radis en germination et en début de croissance est envisagé et interprété.

6°- Les amino-acides et les acides organiques ont été déterminés et dosés chez le Pois, le Radis, les tissus de parenchyme vasculaire de Topinambour. L'évolution dans le temps de ces métabolites montre que les antibiotiques provoquent initialement un trouble important de la protéogénèse, avec accumulation irrégulière d'acides aminés libres. Ce dernier phénomène a été mis à profit pour envisager l'étude de certains métabolismes particuliers : transamination, formation de l'asparagine et de la glutamine, évolution de l'acide γ amino-butyrique, rapports entre la teneur en acides organiques et l'intensité de la respiration.

7° - Les Tétracyclines inhibent d'une façon très importante la génèse des pigments liposolubles. Cette action est d'autant plus intense que l'antibiotique a été appliqué plus prématurément : l'action est maximum lorsque la graine a été immergée dans la solution antibiotique. Sur les plantes déjà développées, une chlorose ne peut être observée que sous l'effet de doses élevées d'antibiotique renouvelées quotidiennement.

8° - L'inhibition n'affecte pas dans des proportions identiques la formation des chlorophylles a et b ; cette propriété est mise à profit pour évoquer le problème de la chlorophyllogénèse. Il est d'autre part démontré qu'une telle activité ne peut être dûe éventuellement à une action chélatante des Tétracyclines.

9° - La génèse des pigments caroténoïdes est fortement compromise par l'action des Tétracyclines. Ces troubles permettent d'envisager la génèse de ces composés : le Phytoène des tissus de réserve n'est semble-t-il, pas utilisé ultérieurement ; la teneur en polyènes colorés est excessivement faible ; les rapports entre polyènes hydrocarbonés et polyènes hydroxylés sont également envisagés.

10° - Le mécanisme général de l'activité des Tétracyclines est interprété. Ces antibiotiques doivent agir primitivement au niveau de la protéogénèse ; les autres manifestations :

- diminution tardive de l'intensité respiratoire,
- troubles dans l'évolution du taux des acides organiques,
- inhibition de la chlorophyllogénèse et de la caroténogénèse,

n'apparaissent que comme des troubles secondaires, dépendant d'une inhibition dans la formation des fractions protidiques d'enzymes catalysant ces différents métabolismes.

BIBLIOGRAPHIE

ACHER R.,FROMAGEOT Cl.,JUTISZ M. - 1950 - Séparations chromatographiques d'acides aminés et de peptides. 5 - Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la Proline.
Bioch.Biophys.Acta . 50 , 81-88.

ALCORN S.M. et ARK P.A. - 1955 - Movement of antibiotics in plants. Proc.12 Gen.Meeting Soc.Ind. Microbiol.,East Lansing,Mich.,p.35.

ARONOFF S. - 1950 - Chlorophyll . Bot.Rev. 16 , 525-588.

ASSELINEAU J. - 1959 - Acides ;in Chromatographie en Chimie organique et biologie , Lederer E. - Ed. Masson. 2 volumes ,tome 2 , 441-488.

BARAUD J. - 1958 - Caroténoïdes de fleurs de Calendula,des fruits de Tamus,Rosa,Malpighia;Physalis. Rev.Gén.Bot. 770 , 221-243.

BARTON L.V. et MACNAB J. - 1954 - Effect of antibiotics on plant growth. Contrib. Boyce Thompson Inst. 17 , 419-434.

BAUER L. - 1952 - Die Trennung der Karotenoïde und Chlorophylle mit Hilfe der Papierschromatographie. Naturwiss. 39 , 88.

BERTOSSI F. - 1953 - Su di una "modificanzione somatica" permanente provocata da diidrostreptomicina in un ceppo di tessuto di Helianthus tuberosus. Atti Ist.Bot.Lab.Critt.(Pavia) 10 , 225 - 229.

BICKOFF E.M.,WHITE L.M.,BEVENUE A. et WILLIAMS K.T. - 1948 - selon Goodwin. J.Assn.Off. Agric.Chem. 31 , 633.

BLANCHARD F.A. et DILLER V.M. - 1951 - Uptake of Aureomycin through the roots of Phaseolus lunatus. Amer.Jour.Bot. 38 , III-112.

BOVE J. et RAVEUX R. - 1957 - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur colonne de silice. I Etude générale ; II Nouvelle technique proposée. Bull.Soc.Chim. fasc.3 , 369-381.

BOVE J.,BOVE C. et RAVEUX R. - 1957 - Extraction,séparation et détermination de certains composés hydrosolubles dans les plantules de diverses cultures de Citrus Limonum.
Rev.Gén.Bot. , 64 , 572-592.

BREBION G. - 1950 - Sur l'excitation de la synthèse de la chlorophylle par divers agents chimiques. C.R.AcSc. ,231 , 1537-39.

BRIAN P.W. - 1957 - Effects of antibiotics on plants.
Ann.Rev.Plant Physiol. , 8 , 413-426.

CAMUS G. et LANCE C. - 1955 - Action de la Pénicilline G sur le développement des tissus végétaux cultivés "in vitro".
Année Biologique , 31 , 263-277.

CANELLAS J. -1953 - A propos des microorganismes du cycle de l'azote dans les terrains traités par antibiotique.
Travaux de l'Institut Botanique de Bordeaux , p 11 et 12.

CHEFTEL I,MUNIER R. et MACHEBOEUF M. - 1952 - Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. II- Utilisation d'une phase solvante alcaline,puis d'une phase solvante acide pour la microchromatographie à deux dimensions.
Bull.Soc.Chim.Bio. , 34 , 380-387.

COMAR C.L. et ZCHEILE F.P. - 1942 - selon Smith et Benitez.
Plant.Physiol. 17 , 198.

CORTESI R. - 1955 - Ricerche sulla tossicita dyli antibiotici e loro influenza sulla germogliazione di qualche sime di vegetali superiori. Boll.Chim.Farm. , 2 , 45-54.

CORTESI R. et GIRARD R. - 1953 - Action de quelques antibiotiques sur le développement et la morphogénèse d'une plante supérieure.
II - Auréomycine,Terramycine et Tyrothricine.
Bull.Soc.Pharm.Bordeaux. , 91 , 225-228.
- 1954 - Action des antibiotiques sur le développement et la morphogénèse des plantes supérieures.
Bull.Soc.Pharm.Bordeaux , 92 , 177.

COSTES Cl et COIC Y. - 1957 - Variation des pigments foliaires en fonction de la carence en azote et du vieillissement chez le Tabac. Ann.Agron. . 2 bis . 32-40.

CRONENBERGER L. - 1956 - Biochimie descriptive et dynamique du Merisier. , Thèse Doctorat Sciences , Lyon.

CROWDY S.H. et PRAMER D. - 1955 - Movement of antibiotics in higher plants. Chem.and Ind. , p. 160-162.

DE DEKEN-GRENSON M. et MESSIN S. - 1958 - La continuité génétique des chloroplastes chez les Euglènes. I - Mécanisme de l'apparition des lignées blanches dans les cultures traitées par la Streptomycine. Biochim.Biophys.Acta , 27 , 145-155.

DELLA BELLA R. et GABELLINI G. - 1950 - Azione delle principi antibiotici da soli e assiciati sulle svilluppe de la radice del Lupinus albus. Soc.Ital.Biol.Exp. , 37 , 1201-1207.

DENES G. et GAZDA Z. - 1953 - selon Venekamp ;
Physiol.Acad.Sc.Hung. , 4 , I.

DOUIN R. - 1953 - Analyse chromatographique sur papier des pigments chlorophylliens. Rev.Gén.Bot. , 60 , 777-795.
- 1956 - Pigments chlorophylliens des Bryophytes,caroténoïdes des Bryales. C.R.Ac.Sc. , 245 , 1051-1054.

DUBASH P.J. et ZUTSHI D.P. - 1959 - Preliminary note on the effect of antibiotics on photosynthesis in Hidrilla verticillata.
Hindoustan Antibiotics Bull. , I , 119-120.

DUPERON R. - 1956 - Identification et dosage des acides organiques hydrosolubles,non volatils,par chromatographie,chez les végétaux. Une nouvelle méthode de dosage par chromatographie sur papier. Rev.Gén.Bot. , 63 , 137-167.

DURANTON H. - 1958 a - Evolution de l'arginine dans le tubercule de Topinambour au cours du cycle végétatif.
C.R.Ac. Sc. , 246 , 2655-2657.
- 1958 b - Sort des atomes de la molécule d'arginine au cours de sa dégradation par les tissus de Topinambour.
C.R.Ac.Sc. , 246 , 3095-3098.
- 1958 c - Sort des atomes du groupement amidine de la molécule d'arginine, au cours de sa dégradation par les tissus de Topinambour. C.R.Ac.Sc. 247 , 502-504.

DURANTON H. et MOREL G. - 1958 - Evolution des acides aminés libres dans des fragments de tubercules de Topinambour cultivés "in vitro". C.R.Ac.Sc. , 246 , 2927-2930.

DUSI H. - 1953 - La chlorophylle rend les plastes d'une Euglène insensible à la Streptomycine. C.R. Ac.Sc. , 237 , 1795.

EULER (von) H. - 1947 - Uber die Keimung von Samen unter Einwirkung antibiotischer Stoffe. I - Beeinflüssung der Chlorophyllbildung,Ark.f.Kemi,Mineral.O.Geol. , 25A , (17) , 1-9.

EULER (von) H. - 1953 - Influence de la Streptomycine et de la Dihydrostreptomycine sur la germination des semences de plantes vertes. Hoppe Seyler's Z.physiol.chem. , 295 , 411-413.

EULER (von) H.,STEIN M.L. - 1955 - Einfluss von Streptomycin und von Tetracyclin auf die Entwicklung keimender Samen.
Experientia , (II) 3 , 108-110.

EULER (von) H.,BRACCO M.,HELLER L. - 1948 - Les actions de la Streptomycine sur les graines en germination des plantes vertes et sur les polynucléotides. C.R.Ac.Sc. , 227 , 18.

GALE E.F. et FOLKES J.P. - 1953 - The assimilation of amino-acids by Bacteria. 15- Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in Staphylococcus aureus.
Biochem.J. , 53 , 493-498.

GODNEV T.N.,ROTFARB R.M. et CHLICK A.A. - 1960 - Sur la possibilité du passage de la chlorophylle a en chlorophylle b dans le processus de biosynthèse.
Dokl.Akad.Nauk.S S S R , 330 ,n°3 , 663-666.

GOODWIN T.W. - 1955 - Carotenoïds ; in Paeck K. et Tracey M.V. : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse ; Springer-Verlag Berlin ed. 4 volumes , 3 , 272-311.
- 1956 - Studies in carotenogenesis;the structure of Echinenone. Biochem.J. , 63 , 481.
- 1958 - The biosynthesis of vitamin A active Carotenoïds . IV° Congrès Intern. Chim. Biol.Vienne.

GOODWIN T.W.,GRIFFITHS L.A. et MODI V.V. - 1956 - Studies in carotenogenesis. 16- The action of some antibiotics,especially streptomycin on carotenogenesis in Phycomyces Blakesleeanus . Biochem.J. , 62 , 259-268.

GRANICK S. - 1951 - Biosynthesis of chlorophyll and related pigments.
Ann.Rev.Plant.Physiol. , 2 , 115-144.

GRAY R.A. - 1955 - Inhibition of root growth by Streptomycin and reversal of the inhibition by Manganese.
Am.J.Bot. , 42 , 327-331.

GRÜNDBERGER D. et ŠORM F. - 1955 - Mecanism of antibiotic action. III.Synthesis of some enzyme systems in living cells of Escherichia coli under the influence of d-Chloramphenicol.
Coll.Czechoslov.Chem.Comm. , 20 , 36-41.

GRÜNDBERGER D.,ŠKODA J. et ŠORM F. - 1955 - Mécanisme d'action des antibiotiques. V- Effet du Chloramphénicol,de la Chlotétracycline et de l'Oxytétracycline sur la synthèse de la décarboxylase glutamique chez Escherichia coli et de la tyrosine décarboxylase chez Streptococcus faecalis.
Coll.Czechoslov.Chem.Comm. , 20 , 507-510.

HAHN F.E. - 1958 - Modes of action of antibiotics.
C.R. IV° Congrès Inter.Chim.Bio. Vienne.

HAHN F.E.,SCHAECHTER M.,CEGLOWSKI W.S.,HOPPS H.E. et CIAK J. - 1957 - Interrelations between nucleic acid and protein biosynthesis. I- Synthesis and fates of bacterial nucleic acids during exposure to,and recovery from the action of Chloramphenicol.
Biochem.Biophys.Acta. , 26 , 469.

HELLER R. - 1953 - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro" Thèse Doctorat ès Sciences. Paris.

HERVEY J.R. - 1955 - Stimulation of soil microorganisms by antibiotics.
Antibiotics and Chemotherapy. 5 , 96-100.

ISHERWOOD F.A. - 1946 - selon Bové et Raveux.Biochem.J. 40 , 688.

JANOT M.M. et KEUFER J. - 1953 - Mécanisme biochimique de l'activité des antibiotiques. Un volume ; Masson éditeur.

JOLCHINE G. - 1956 - Les acides organiques des feuilles de Bryophyllum Daigremontianum Berger.
Bull.Soc.Chim.Bio. 38 , 481-493.

KARRER P. et JUCKER E. - 1950 - Caroténoïds. Un volume ; Elsevier Publishing Co inc. éditeur .

KHOUVINE Y.,BARON F.,GREGOIRE J.,HIRSCH M.L.,LUBOCHINSKY B.,MORTREUIL M. et ZALTA J.P. - 1954 - Obtention et analyse des protéines liées aux acides nucléiques dans les tissus cancéreux.
Bull.Soc.Chim.Bio. , 36 , 31-40.

KLEMMER H.W.,RICKER A.J. et ALLEN O.N. - 1955 - Inhibition of crown-gall by selected antibiotics. Phytopath. , 45 , 618-625.

KOE B.K. et ZECHMEISTER L. - 1953 - In vitro conversion of Phytofluene and Phytoene into carotenoïds pigments.Arch.Biochem.Biophys. 46 , 100.

KRIBBEN F.J. - 1953 - Der Einfluss der Antibiotika Terramycin und Leukomycin auf das Streckungswachstum höherer Pflanzen.
Naturwiss. , 41 , 144-145.

LACHARME J. - 1959 - Aperçu sur l'étude du mode d'action de quelques antibiotiques. Lyon Pharm. , 10 ; 259-287.

- 1960 - Séparation des pigments caroténoïdes dans le matériel végétal. Bull.Soc.Pharm Lyon (sous presse).

LACHARME J. et NETIEN G. - 1958 - Action des antibiotiques du groupe Tétracycline sur le métabolisme des acides aminés d'une culture de tissus de Topinambour. C.R.Congrès Inter.Bioch. Vienne. p. 148.

LANCE C. et CAMUS G. - 1954 - Action de la Pénicilline G sur la croissance et la rhizogénèse des tissus de la racine de Carotte.
Compt.Rend.Soc.Biol. (Paris) , 148 , 512-515.

LEFORT M. et SIGNOL M. - 1955 - Méthode rapide de séparation des principaux pigments foliaires par chromatographie sur papier. Rev.Gén.Bot. , 62 , 683-685.

LEOPOLD A.C. et GUERNSEY F.S. - 1953 - Effects of antibiotics on plant growth. Hort.Dept. , Purdue Univers.Mineo Rpt 4pp,janv. 1953.

LOOMIS W.F. - 1950 - On the mecanism of action of Aureomycin.
Science , 3 , 474.

LYENGAR M.R.S. et STARKEY R.L. - 1953 - Synergism and antagonism of auxin by antibiotics. Science , 118 , 357-358.

LWOFF A. - 1949 - La décoloration d'Euglena gracilis par la Streptomycine. C.R.Ac.Sc. , 228 , 779-781.

LWOFF A. et SCHAEFFER P. - 1949 - Remarques sur une analogie structurale entre Streptomycine et Chlorophylle.
C.R.Ac.Sc. , 228 , 511-513.

MACKINNEY G. et CHICHESTER C.O. - 1960 - Biosynthesis of carotenoïds, in "comparative biochemistry of photoreactive systems" editeur Academic Press. N.Y. , 205-214.

MACHT D.I. et HOFFMASTER T.E. - 1950 - The action of antibiotics on oxydation reduction and enzymes of Lupinus seeds.
Arch.Intern.Pharmacodyn. et Therapie. , 83 ; 207-212.

MANCINELLI A. - 1957 - Azione della Penicillina sul consumo di O_2 di semi in germinazione. Annali di Botanica, vol.25 , fasc.3.

MARDASHEV S.R. et LESTROVAJA N.N. - 1953 - selon Webster et selon Venekamp. Docklady Nauk S S S R , 78 , 547.

MC PHERSON H.T. - 1946 - The basic amino-acid content of proteins.
Biochem.J. , 40 , 470.

MENAGE A. - 1959 - Evolution des acides aminés dans les tissus de Topinambour cultivés "in vitro" en présence de Pénicilline.
Bull.Soc.Physio.Végétale. 5 , 200.

MENTZER Ch.,BUU-HOI Ng,NETIEN G. et LACHARME J. - 1952 - Une anomalie de croissance présentée par la racine de Blé sous l'effet de certaines substances chimiques. Le phénomène de griffe.
Soc.Linn.Lyon , 6 , 139-143.

NASH H.A.,QUAKENBUSH F.W. et PORTER J.W. - 1948 - selon Goodwin T.W.
J.Amer.Chem.Soc. , 70 , 3613.

NETIEN G. et LACHARME J. - 1955 a - Apparition de pigments anthocyaniques;test d'activité des antibiotiques sur la plantule de Radis.
C.R.Ac.Sc. , 240 , 692-694.
- 1955 b - Recherche sur l'action de la Terramycine dans la formation des pigments de la plantule de Radis.
Bull.Soc.Chim.Bio. , 37 , 643-653.
- 1957 - Influence des Tétracyclines dans la biogénèse des pigments chlorophylliens des plantules de Radis et de Blé. Compt.Rend.Soc.Biol. , 151 , 127-129.
- 1959 - Recherches sur l'action des antibiotiques du groupe de la Tétracycline sur les plantes.
Bull.Soc.Linn.Lyon. , 28 ; 12-16.

NETIEN G. et SOTTY O. - 1955 - Recherches sur les antibiotiques inhibiteurs de la croissance des plantes.
Bull.Soc.Linn.Lyon. , 24 , 86-92.

NETIEN G.,HUTINEL P. et SOTTY O. - 1952 - Action de l'Auréomycine au cours de la germination.
Compt.Rend.Soc.Biol. (Paris) 146 , 1337-39.

NICKELL L.G. - 1952 a - Stimulation of plant growth by antibiotics.
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med. 80 , 615-617.
- 1952 b - Antibiotics in the growth of plants.
Antibiotics and Chemotherapy , 3 , 449-459.
- 1953 - Los antibioticos en el crecimiento de las plantas.
Antibiotics and Chemotherapy , 3 , 469-470.

NICKELL L.G. et FINLAY A.C. - 1954 - Growth modifiers. Antibiotics and their effects on plant growth
Jour.Agric. and Food Chem. , 2 , 178-182.

ODDOUX L. - 1960 - Activité antibiotique des Mycéliums d'Homobasidiés en culture pure. Thèse Doctorat Etat Pharmacie , Lyon;ed.Patissier.
OSTEUX R.,GUILLAUME J. et LATURAGE J. - 1958 - Séparation des acides aliphatiques volatils .
J.Chromat. , I , 70-85.

PETRACEK F.J. et ZECHMEISTER L. - 1952 - Stereoisomeric Phytofluenes.
J.Amer.Chem.Soc. , 74 , 184.

PORTER J.W. et LINCOLN R.E. - 1950 - I - Lycopersicon selection containing a high content of Carotenes and colorless polyenes.
II - The mecanism of Carotene biosynthesis.
Arch.Biochem. , 27 , 390.

PORTER J.W. et ZCHEILE F.P. - 1946 - Naturally occuring colorless Polyenes. Arch.Biochem. , 10 , 547.

PRAMER D. - 1955 - Adsorption of antibiotics by plant cells.
Science , 121 , 507.

PROVASOLI L.,HUNTER S.H. et SCHATZ A. - 1948 - Streptomycin induced chlorophylless races of Euglena.
Prod.Sec.Exp.Biol. and Med. , 69 , 279-282.

RANSON S.L. - 1955 - Non volatile Mono-,Di- and Tricarboxylic acids. in Paeck K. et Tracey M.V. : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Springer-Verlag Berlin éd. 4 volumes. 2 , 539-582.

ROPP (de) R.S. - 1946 - Penicillin as a plant hormone. Nature 158-555.
- 1949 - The action of antibacterial substances on the growth of Phytomonas tumefaciens and Crown-gall tumor tissue.
Phytopath. , 39 , 822-828.

SAZ A.K. et MARTINEZ L.M. - 1956 - Enzymatic basis of resistance to Aureomycin . I - Differences between flavoprotein nitro reductases of sensitive and resistant Escherichia coli.
J.Biol.Chem. , 223 , 285-292.

SCHEFFER K.A. et KLOKE A. - 1954 - Der Einfluss von Antibiotika auf die Entwicklung und den Nahrstoffgehalt von Kulturpflanzen.
Z.Pflanzenernahr.Dung.Bodenk. , 66 , 29-38.

SCHÖPFER W.H.,BEIN M. et BESSON G. - 1951 - Action de la Streptomycine et de la Chloromycétine sur la biogénèse de la chlorophylle et des caroténoïdes chez Pisum. Act.Soc.Helv.Sci.Nat. , 148-149.

SCHÖPFER W.H.,GROB E.,BESSON G. et KELLER V. - 1952 - Recherches sur les inhibiteurs du développement et de la biogénèse des caroténoïdes. I - La streptomycine . Arch.Sci. (Genève) , 5 , 108-111.

SCHÖPFER W.H.,GROB E. et BESSON G. - 1952 - Recherches sur les inhibiteurs de la croissance et de la biogénèse des caroténoïdes.
II - L'hydrazide de l'acide maléique et l'hydrazide de l'acide isonicotinique.Arch.Sci. (Genève) 5 , 112-115.

SHEMIN D. - 1956 - The biosynthesis of porphyrins; the succinate-glycine cycle. in Currents in Biochemical Research. Editeur ; Interscience, N.Y. , 518-535.

SIEGELMAN H.W. et HENDRICKS S.B. - 1957 - Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings.
Plant Physiol. , 32 , 393-398.

SIGNOL M. - 1954 a - Etude des modifications cytologiques induites par la Dihydrosteptomycine chez les plantules d'Orge.
Compt.Rend.Soc.Biol. (Paris) , 148 , 263-265.
- 1954 b - Action de la Dihydrostreptomycine sur les chloroplastes de prothalles de Fougères cultivés "in vitro".
C.R.Ac.Sc. 238 , 2332-2334.
- 1954 c - Action de la Dihydrostreptomycine sur la croissance et la pigmentation des plantules d'orge.
Compt.Rend.Soc.Biol. (Paris) , 148 , 646-648.

SINIGAGLIA M.G. - 1955 - Azione "in vitro" della Penicillina e della Diidrostreptomicina sugli scambi gassosi del seme di Lupine bianco nei primi giorni di svillupe.
Arch.Ital.Sc.Farmaco. , série III , 5 , 29-39.

SIRONVAL C. - 1954 - Etude le l'activité de la chlorophyllase par chromatographie sur papier. Physiol. Plant. , 3 , 523-530.
- 1958 - La photopériode et la sexualisation du Fraisier des quatre saisons à fruits rouges (métabolisme chlorophyllien et hormone florigène) Arch.Institut Bot.Liège , 25 , 5-229.

SMITH J.H.C. et BENITEZ A. - 1955 - Chlorophylls : Analysis in plant materials ; in Paech K. et Tracey M.V. : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Edit. Springer-Verlag Berlin , 4 volumes 4 , 142-196.

SMITH W.J. - 1946 - Effect of Penicillin on seed germination.Science , 104 , 411-413.

SŎRM F. et ZELINKOVA M. - 1955 - Mécanisme d'action des antibiotiques sur le développement des germes de plantes.
Dokl.Akad.Nauk S S S R , 100 , 525-528.

ŠORM F.,ZELINKOVÀ M. et ŠORMOVA J. - 1954 - Sur le mécanisme d'action des antibiotiques. II - Action spécifique du d-Chloramphénicol sur le développement des germes de plantes.
Coll.Czechoslov.Chem.Comm. , 19 , 1324-1329.

ŠORMOVA J. et ŠORM F. - 1954 - Modifications du titre des acides nucléiques des pousses de Pois dans les différentes phases de leur développement et sous l'effet du d-Chloramphénicol.
Coll.Czechoslov.Chem.Comm. , 20 , 674-678.

SOTTY O. - 1955 - Recherches expérimentales sur la croissance des plantes en présence d'antibiotiques. Thèse Doctorat en Pharmacie, Lyon.

STRAIN H.H. - 1939 - Carotene. XI - Isolation and detection of carotene, and the Carotene of Carrot roots and of butter.
J.Biol.Chem. , 127 , 191.

THOMAS H.R. - 1953 - Effects of antibiotics on health and growth of plants. Proc.S.Sc.Soc.Florida , 13 , 17-25.

TOMISEK A.,REID M.R.,SHORT W.A. et SKIPPER H.E. - 1957 - Studies on the photosynthetic reaction. III - The effects of various inhibition upon growth and carbonate fixation in Chlorella pyrenoïdea Plant.Physiol. , 32 , 7-10.

UMBREIT W.W.,BURRIS R.H. et STAUFFER J.F. - 1959 - Manometric Techniques ; unvolume , Editeur : Burgess Publishing Co , Minneapolis.

VAN DUUREN A.J. - 1953 - The determination of organic acids plant material by means of paper chromatography.
Rec.Trav.Chim.Pays Bas , 72 , 889-892.

VENEKAMP J.H. - 1955 - The metabolism of amides and amino-acids in etiolated seedlings of Lupinus luteus L.
Act.Bot.Neerl. , 4 , 487-550.

VENTURA M. - 1958 - Efeito do magnesio,manganese,cobalto na accao fitotoxica da Terramicina e Aureomicina.
Port.Acta.Biol. , 5 , 305-318.

VENTURA M. et HOLLANDA L. - 1956 - Effect of antibiotics on respiration of plant tissues.Phyton , 7 , 1-5.

VON WEIHE K. - 1953 - Die Wirkung von Na-Benzyl-Penicillin auf die Samenkeimung und das Wurzelwachstum. I - Naturwiss. , 40 , 203-204.
- 1954 - Die Wirkung von Na-Benzyl-Penicillin auf die Samenkeimung und das Wurzelwachstum. II - Naturwiss. , 41 , 233-234.

WALLACE V. et PORTER J.W. - 1952 - Phytofluene.
Arch.Biochem.Biophys. , 36 , 468.

WEBSTER G.C. - 1958 - Nitrogen metabolism in plants. Un volume Edit. : Row, Peterson ans Co, N.Y.

WEBSTER G.C. et VARNER J.E. - 1955 - Aspartate metabolism and asparagine synthesis in plant systems.
J.Biol.Chem. , 215 , 91-99.

WILSON G.B. - 1950 - Cytological effects of some antibiotics. Jour;Hered. , 41 , 226-231.

WILSON G.B. et BOWEN C.C. - 1951 - Cytological effects of some more antibiotics. Jour. Hered. , 42 , 251-255.

WINTER A.G. - 1952 - Untersuchungen über die Aufnahme von Penicillin und Streptomycin durch die Wurzeln von Lepidium sativum L. und ihre Bestandigkeit in natürlichen Boden.
Zeit.f.Bot., 40 , 153-172.

WINTER A.G. et WILLEKE L. - 1951 - Uber die Aufnahme von Antibioticis durch höhere Pflanzen und ihre Stabilität in naturlichen Boden.
Naturwiss. , 38 , 457-458.

WRIGHT J.M. - 1951 - Phytotoxic effects of some antibiotics.
Ann.Bot. , 15 , 493-499.

ZALTA J.P. et KHOUVINE Y. - 1953 - Dosage de la lysine, de la tyrosine et de l'arginine. Bull.Soc. Chim.Bio. , 35 , 697-701.

ZECHMEISTER L. - 1957 - Some "in vitro" conversions of naturally occuring Carotenoïds.
Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe , 15 , 37.

ZECHMEISTER L. et HAXO F. - 1946 - Phytofluene in Neurospora.
Arch.Bioch.Biophys. , II , 539.

ZECHMEISTER L. et KARMAKAR G. - 1953 - The occurence of Phytofluene in green plant organs. Arch. Bioch.Biophys. , 47 , 160.

ZECHMEISTER L. et KOE B.K. - 1954 - Stepwise dehydrogenation of the colorless polyennes Phytoene and Phytofluene with N-bromosuccinimide to caroténoïd pigments. J.Amer.Chem.Soc. , 16 , 2923

ZECHMEISTER L. et POLGAR A. - 1944 - On the occurence of a fluorescing polyene with a characteristic spectrum.
Science , 100 , 317.

ZECHMEISTER L. et SANDOVAL A. - 1945 - The occurence and estimation of Phytofluene in plants.
Arch.Bioch.Biophys. , 8 , 425.
- 1946 - Phytofluene.
J.Amer.Chem.Soc. , 68 , 197.

ZELINKOVÀ M. et ŠORM F. - 1955 - Mécanisme d'action des antibiotiques.
IV - Accumulation d'acides aminés libres dans les plantules en germination sous l'influence du d-Chloramphénicol.
Coll.Czechoslov.Chem.Comm. , 20 , 215-219.

TABLE DES MATIERES

PREFACE 1
HISTORIQUE 5

CHAPITRE I - Action des Tétracyclines sur les phénomènes de croissance 11
Action des Tétracyclines sur la croissance des plantules de différentes espèces 11
- Graines mises en contact avec l'antibiotique 11
- Développement des racines latérales de Pois 20
Action sur les cultures de tissus 23

CHAPITRE 2 - Action sur l'hydratation des graines et des tissus 31

CHAPITRE 3 - Action des Tétracyclines sur la respiration 35

CHAPITRE 4 - Action sur le métabolisme azoté et sur le métabolisme des acides organiques 43
Techniques expérimentales 44
Métabolisme azoté : résultats expérimentaux 53
Acides organiques : résultats expérimentaux 63
Interprétation des résultats 70

CHAPITRE 5 - Action sur le métabolisme des pigments acétonosolubles 83
Techniques expérimentales 84
Résultats expérimentaux :
- Essais préliminaires 89
- Action de la Tétracycline sur :
- la graine de Radis 90
- la plantule de Radis 94
- les plantules de Sarrasin, Moutarde et Haricot 94
- les plantules de Pois et sur diverses cultures de tissus 104
Recherches d'une action antagoniste à celle des Tétracyclines 115
Interprétation générale : - Chlorophylles 117
- Caroténoïdes 119

CHAPITRE 6 - Interprétation générale du mécanisme d'action des Tétracyclines . 123

CONCLUSIONS 127

BIBLIOGRAPHIE 129

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

Données récentes sur le métabolisme intermédiaire
de la photosynthèse.

Vu :
Les membres du Jury :

R. DOUIN
R. KUHNER
J. CHOPIN

Vu et approuvé :
le Doyen de la Faculté des Sciences,

H. GAUTHIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 6 janvier 1961

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

Imprimé au Centre de Documentation
et d'Equipement Pédagogiques
47 - 49, Rue Philippe de Lassalle
LYON 4e